



RENORBIO

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Biomarcadores no câncer de mama e ovário: uma correlação entre
alterações genéticas e aspectos histopatológicos

Eldamária de Vargas Wolfgramm

Vitória-ES

2013

ELDAMÁRIA DE VARGAS WOLFGRAMM

**BIOMARCADORES NO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO: UMA CORRELAÇÃO
ENTRE ALTERAÇÕES GENÉTICAS E ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Lúri Drumond Louro

VITÓRIA

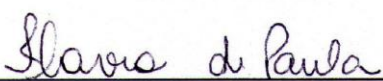
2013

ATA – DEFESA DE TESE


Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna ELDAMÁRIA DE VARGAS WOLFGRAMM Ao quarto dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e treze, às 14 horas e 30 minutos, reuniu-se a banca de Defesa de Tese composta pelos Professores Doutores Iuri Drumond Louro, (Orientador), Flávia de Paula, da Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular, Greiciane Gaburro Paneto, da Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular, Francisco de Paula Careta, Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular, Melissa de Freitas Cordeiro Silva, Faculdade Salesiana de Vitória, como Titular, perante a qual **Eldamária de Vargas Wolfgramm**, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal do Espírito Santo, defendeu, para preenchimento do requisito de doutor, sua Tese intitulada “Biomarcadores no câncer de mama e ovário: uma correlação entre alterações genéticas e aspectos histopatológicos.” A defesa da referida tese ocorreu, das 14:30 às 16:50, tendo a doutoranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda APROVADA por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito SATISFATORIO. Eu, Iuri Drumond Louro que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Registre-se que esta é a Sétima Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Espírito Santo. Em Vitória, 04 de fevereiro de 2013.



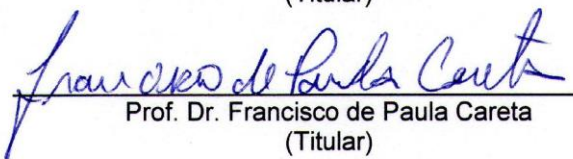
Prof. Dr. Iuri Drumond Louro
(Orientador)




Profª. Drª. Flávia de Paula
(Titular)



Profª. Drª. Greiciane Gaburro Paneto
(Titular)



Prof. Dr. Francisco de Paula Careta
(Titular)



Profª. Drª. Melissa de Freitas Cordeiro Silva
(Titular)

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram durante todos os momentos, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua infinita graça e fidelidade, auxiliou-me nesta conquista criando oportunidades e colocando em minha vida pessoas pelas quais tenho que agradecer por mais esta vitória.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação imensuráveis, pelo esforço e apoio para que eu sempre pudesse me dedicar aos estudos. *Ao meu irmão* pelo amor e amizade. *E ao meu noivo Maycon*, por todo amor, paciência, companheirismo e incentivos constantes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Iúri Drumond Louro, pela oportunidade, paciência e ensinamentos durante toda esta trajetória, os quais muito contribuíram para a minha formação profissional. Foi uma honra ter sido sua orientanda!

Ao Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, exemplo de ética e amor à pesquisa e ao ensino, muito obrigada por toda a ajuda e ensinamento no estudo epidemiológico.

Ao Dr. Allan Kardec de Castro Neto, pela gentil e preciosa colaboração, e a *toda sua equipe da Patologia do Hospital Santa Rita de Cássia*, especialmente *ao funcionário Júnior*, por toda disposição, trabalho e alegria em nos ajudar; sem a colaboração de vocês não seria possível a realização deste trabalho.

Às Profas Dra. Flavia de Paula e Dra. Maria do Carmo P. Batitucci, por estarem sempre acessíveis e dispostas a ajudar e ensinar.

Ao Prof. Dr. Yuri Luiz Reis Leite, por sempre permitir a utilização do Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) para a realização de algum experimento.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição e paciência em analisar este trabalho.

Às minhas queridas amigas Mariana De Nadai e Thais Tovar, sem as quais os intermináveis dias de trabalho não teriam sido tão divertidos e agradáveis; agradeço por toda ajuda, carinho, companheirismo; a amizade de vocês é muito valiosa.

À “minha” aluna de iniciação científica Lyvia N. R. Alves, pela paciência e disposição em ajudar. O seu auxílio muito contribuiu para esta tese.

À Camila F. B. Gavioli, Mayara L. Entringer e Elaine Stur, sem a ajuda de vocês eu ainda estaria mergulhada nos intermináveis livros de registro dos serviços de Patologia.

Aos demais colegas de laboratório, em especial, Clara, Geise, Raquel Spinassé, Márcio, Vitor, pela convivência e ajuda. Vocês estarão guardados eternamente em meu coração.

À Xuxu (Ângela), Rosana e Regina, muito obrigada pelas conversas e conselhos.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Ponto focal da Universidade Federal do Espírito Santo, muito obrigada pela atenção e ajuda na resolução dos assuntos burocráticos da tese.

A todas as outras pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram-me a escrever parte desta história; a vocês, minha eterna gratidão!

À FAPES e a Capes pela bolsa de doutorado concedida e a Fibria pelo financiamento deste projeto.

“É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, quem em conformidade viver...”

Martin Luther King

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese é apresentada em formato de Artigo Científico.

As listas de figuras, tabelas e siglas e abreviaturas contêm as ilustrações, tabelas e siglas apresentadas na introdução e revisão bibliográfica deste trabalho.

RESUMO

O câncer de mama e o câncer de ovário são doenças de base hormonal e polimorfismos em genes de suscetibilidade genética envolvidos na biossíntese e metabolização de hormônios esteroides parecem ter um papel importante na carcinogênese desses tumores. Particularmente, a análise de polimorfismos nas regiões repetidas em tandem (STR – *Short tandem repeat*) permite a identificação de dois eventos: a instabilidade de microssatélites (MSI) e a perda de heterozigose (LOH). Para verificar a presença de MSI e LOH nos tumores da mama e do ovário, 12 marcadores do tipo STR (CYP11, CYP19, UGT1A1, AR, ER α , ER β , D5S346, D17S250, D10S197, D8S135, D3S1611 e D2S119) foram analisados neste estudo pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) em 107 casos de câncer de mama e em 24 amostras de câncer ovariano. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphism*) A313G em GSTP1 e T27C em CYP17 também foram analisados com o intuito de estimar a frequência de polimorfismos nesses genes de suscetibilidade. Além do estudo molecular, um levantamento epidemiológico foi realizado por meio da análise de registros dos serviços de Patologia de dois hospitais referências em oncologia no Espírito Santo, durante os períodos de 2001 a 2004 e 2009-2010. O estudo epidemiológico observou 1.758 tumores malignos da mama e 119 tumores malignos do ovário, os quais apresentaram idade média ao tempo de diagnóstico de 53,59 anos para os tumores da mama e 52,98 para os tumores do ovário. Entre os tumores da mama, o carcinoma ductal infiltrante foi o tipo histológico mais frequente, e um aumento de casos de tumores malignos na mama foi observado em mulheres com idade ≤ 35 anos durante o período de 2009-2010 em relação ao período de 2001-2004. O estudo molecular demonstrou que LOH é um evento mais frequentemente observado que a MSI, tanto no câncer mamário quanto no câncer ovariano. Nos carcinomas da mama, a combinação de marcadores do tipo STR demonstrou que CYP19, AR e ER β , quando analisados juntos, foram correlacionados com os parâmetros de grau histológico III, tumores RE (receptor de estrogênio) negativos e tumores RP (receptor de progesterona) negativos. A combinação de marcadores não apresentou resultados significantes nos tumores do ovário. Combinação entre os marcadores do tipo STR e os genótipos de GSTP1 e

CYP17 foram realizadas e correlações positivas foram observadas entre portadoras do genótipo Ile/Ile no gene GSTP1 e alterações em AR+CYP19 ($p=0.021$) e AR+ER β +CYP19 ($p=0.036$) em tumores da mama PR negativos, e entre portadoras do genótipo A1/A1 no gene CYP17 e alterações em AR+ER β e AR+ER β +CYP19 em tumores da mama ER negativos e PR negativos ($p=0.039$ para todas as combinações). Para os casos de câncer ovariano não foram observadas correlações entre a combinação de marcadores do tipo STR e os genótipos de GSTP1 e CYP17. Estes resultados suportam a hipótese que genes relacionados ao metabolismo de esteroides são importantes na caracterização do câncer de mama e que a análise de um único marcador é frequentemente não indicativa de associação positiva com o carcinoma mamário.

Palavras-chave: Câncer de mama. Câncer de ovário. Epidemiologia. Estudo molecular. Marcadores do tipo STR. SNP. Espírito Santo.

ABSTRACT

Breast and ovarian cancers are hormone-related diseases and polymorphisms in cancer genetic susceptibility genes involved in the production and metabolism of steroid hormones play an important role in the carcinogenesis of these tumors. Particularly, polymorphisms in short tandem repeat regions (STR) provide information about two events: microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH). To check the presence of MSI and LOH in breast and ovarian cancers, 12 STR markers (CYP11, CYP19, UGT1A1, AR, ER α , ER β , D5S345, D17S250, D10S197, D8S135, D3S1611 and D2S119) were analyzed in this study by Polymerase Chain Reaction (PCR) in 107 breast and 24 ovarian tumors. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in GSTP1 (A313G) and CYP17 (T27C) genes were also analyzed to estimate the frequency of susceptibility gene polymorphisms. In addition to the molecular analysis, an epidemiological study was conducted through the analysis of two oncology reference Hospital Pathology Service records in Espirito Santo, Brazil, during years 2001 to 2004 and 2009 to 2010. The epidemiological study detected 1,758 malignant breast and 119 ovarian tumors. Mean ages for malignant breast and ovarian tumors were 53.59 and 52.98 years, respectively. Among breast tumors, infiltrating ductal carcinoma was the most frequent malignant tumor and an increased tumor frequency in age group ≤ 35 years was observed for other malignant tumors of the breast in the time period 2009-2010, as compared to time period 2001-2004. The molecular study has shown that LOH is an event more frequently observed than MSI, in both breast and ovarian cancers. In breast carcinomas, the combination of STR markers showed that AR, CYP19 and ER β , when analyzed together, were correlated with parameters of histological grade III, ER (estrogen receptor) negative tumors and PR (progesterone receptor) negative tumors. The combination of markers did not show significant results in ovarian tumors. Combination between STR markers and GSTP1 and CYP17 genotypes were performed, showing positive correlations among GSTP1 Ile/Ile genotype, AR+CYP19 ($p=0.021$) and AR+ER β +CYP19 ($p=0.036$) alteration in PR negative breast cancers, while CYP17 A1/A1 genotype was associated with AR+ER β and AR+ER β +CYP19 alterations in ER and PR negative breast tumors ($p=0.039$ to all combinations). We did not find associations between gene combinations and ovarian tumors. These data support the hypothesis that genes

related to steroid metabolism are important in the characterization of breast cancer and that the analysis of a single polymorphism may not be enough to molecularly characterize a tumor.

Keywords: Breast cancer. Ovarian cancer. Epidemiology. Molecular study. STR markers. SNP. Espírito Santo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxas de incidência e de mortalidade por câncer de mama na população feminina para o ano de 2008 segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).....	25
Figura 2 - Fatores associados com aumento (↑) ou diminuição (↓) do risco do câncer de mama em mulheres.....	28
Figura 3 - Esquematização da microanatomia da mama: representação da unidade terminal ductolobular.	35
Figura 4 - Classificação molecular do câncer de mama.....	39
Figura 5 - Taxas de incidência e de mortalidade por câncer de ovário na população feminina para o ano de 2008 segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).....	46
Figura 6 - Fatores associados com aumento (↑) ou diminuição (↓) do risco do câncer de ovário em mulheres.....	49
Figura 7 - Biossíntese do estradiol a partir da cadeia do colesterol	66
Figura 8 - Metabolismo do estradiol	69
Figura 9 - Ilustração do mecanismo de <i>slipped</i> que pode ocorrer durante a replicação do DNA.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes para o câncer de mama nas regiões e estados brasileiros segundo o INCA.....	26
Tabela 2 - Classificação histológica dos carcinomas da mama segundo a Organização Mundial de Saúde (2003).....	36
Tabela 3 - Estimativa para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes para o câncer de ovário nas regiões e estados brasileiros segundo o INCA.....	47
Tabela 4 - Classificação das neoplasias ovarianas segundo a OMS – versão simplificada (2003)	54
Tabela 5 - Estadiamento dos tumores ovarianos definido pela FIGO	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- A1 – Alelo normal em CYP17
- A2 – Alelo polimórfico em CYP17
- Ala – Alanina
- AR – Receptor de androgênio
- BAT25 – Marcador microssatélite mononucleotídico
- BAT26 – Marcador microssatélite mononucleotídico
- BRCA1 – *Breast cancer 1 gene*
- BRCA2 – *Breast cancer 2 gene*
- CA125 – Marcador sorológico tumoral para câncer ovariano
- CCNB1 – Ciclina B1
- CDIS – Carcinoma ductal *in situ*
- CD24 – Glicoproteína de superfície celular
- CD44 – Glicoproteína de superfície celular
- CDH1/E-cadherin – Caderina 1, tipo 1, E-caderina
- CYP1A1 – Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1
- CYP1B1 – Citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1
- CYP11A – Citocromo P450, família 11, subfamília A
- CYP17 – Citocromo P450, família 17
- CYP19 – Citocromo P450, família 19
- COMT – Catecol-O-metiltransferase
- DHEA – Dehidroepiandrosterona
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- D2S119 – Marcador microssatélite dinucleotídico
- D2S123 – Marcador microssatélite dinucleotídico
- D3S1611 – Marcador microssatélite dinucleotídico
- D5S346 – Marcador microssatélite dinucleotídico
- D8S135 – Marcador microssatélite dinucleotídico
- D10S197 – Marcador microssatélite dinucleotídico
- D17S250 – Marcador microssatélite dinucleotídico
- E1 – Estrona
- E2 – 17 β -estradiol ou estradiol

ER α – Receptor de estrogênio alfa
ER β – Receptor de estrogênio beta
EUA – Estados Unidos
FDA – *United States Food and Drug Administration*
FIGO - *International Federation of Gynecology and Obstetrics*
FSH – Hormônio folículo-estimulante
GST – Glutathione-S-transferase
GSTP1 – Glutathione-S-transferase pi 1
 β -HCG – Gonadotrofina coriônica, subunidade beta
HER1 – Receptor do fator de crescimento epidérmico
HER2 – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HER2 1+ – Tumores não elegíveis para tratamento com anticorpo anti-HER2
HER2 2+ – Tumores de resultado indeterminado para tratamento com anticorpo anti-HER2
HER2 3+ – Tumores elegíveis para tratamento com anticorpo anti-HER2
HNPCC – Síndrome do câncer colorretal hereditário não polipoide
IGF1 – Fator I de crescimento semelhante à insulina
IGFBP – Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
Ile – Isoleucina
INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
Ki-67 – Marcador de proliferação celular
LH – Hormônio luteinizante
LKB1/STK11 – Serina/treonina quinase
LOH – Perda de heterozigose
MKI67 – Gene que codifica o marcador de proliferação celular Ki-67
MLH1 – *Human mutL homolog 1*
MMR – *Mismatch repair*
MSH2 – *Human mutS homolog 2*
MSH6 – *Human mutS homolog 6*
MSI – Instabilidade de microssatélites
MSI-H – Alto grau de instabilidade de microssatélite
MSI-L – Baixo grau de instabilidade de microssatélite
MYBL2 – *V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2*
NCI – *National Cancer Institute*

NSABP-P-1 – *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAH – Hidrocarboneto aromático policíclico

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PMS2 – *Human PSM2 protein homolog 2*

PTEN – Proteína homóloga da tensina e fosfatase

RB – Retinoblastoma

RE – Receptor de estrogênio

RP – Receptor de progesterona

SERM – Modulador seletivo de receptores de estrogênio

SHBG – Globulina de ligação ao hormônio sexual

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SOD – Superóxido dismutase

SOE – Carcinoma ductal infiltrante sem outra especificação

STR – Regiões repetidas em *tandem*

SULT – Sulfotransferase

TP53 – Gene codificador da proteína de supressão tumoral p53

TRH – Terapia de reposição hormonal

UGT – UDP glucuronosiltransferase

UGT1A1 – UDP glucuronosiltransferase, família1, polipeptídeo A1

UGT1A1*1 – alelo com seis repetições TA no gene UGT1A1

UGT1A1*28 – alelo com sete repetições TA no gene UGT1A1

UGT1A1*33 – alelo com cinco repetições TA no gene UGT1A1

UGT1A1*34 – alelo com oito repetições TA no gene UGT1A1

UTDL – Unidade terminal ductolobular da mama

Val – Valina

3 β -HSB – 3-beta-hidroxisteroide desidrogenase

17 β -HSD – 17-beta-hidroxisteroide desidrogenase

2-OHE₂ – 2-hidroxiestradiol

4-OHE₂ – 4-hidroxiestradiol

2-MeOE₂ – 2-metoxiestradiol

4-MeOE₂ – 4-metoxiestradiol

E₂-2,3SQ – Semiquinona

E₂-3,4SQ – Semiquinona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.1.1 Objetivos específicos	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 CÂNCER DE MAMA	24
3.1.1 Epidemiologia	24
3.1.2 Fatores de risco	27
3.1.2.1 <i>História familiar de câncer de mama</i>	28
3.1.2.2 <i>Idade e sexo</i>	29
3.1.2.3 <i>Etnia/raça</i>	29
3.1.2.4 <i>Fatores reprodutivos e hormonais</i>	30
3.1.2.4.1 <i>Menarca e menopausa</i>	30
3.1.2.4.2 <i>Gestação e amamentação</i>	30
3.1.2.4.3 <i>Hormônios exógenos</i>	31
3.1.2.5 <i>Obesidade e sedentarismo</i>	32
3.1.2.6 <i>Densidade mamária</i>	32
3.1.2.7 <i>Doenças benignas da mama</i>	33
3.1.2.8 <i>Radiação</i>	33
3.1.2.9 <i>Etilismo</i>	33
3.1.2.10 <i>Tabagismo</i>	34
3.1.3 Classificação dos carcinomas mamários	34
3.1.3.1 <i>Classificação histológica</i>	34
3.1.3.2 <i>Classificação molecular</i>	37
3.1.4 Diagnóstico e prevenção	39
3.1.4.1 <i>Quimioprevenção</i>	40
3.1.5 Fatores prognósticos	41
3.1.5.1 <i>Receptores hormonais</i>	43
3.1.5.2 <i>Status da oncoproteína HER2</i>	43
3.1.6 Tratamento	44
3.2 CÂNCER DE OVÁRIO	45

3.2.1 Epidemiologia	45
3.2.2 Fatores de risco	48
3.2.2.1 <i>História familiar de câncer de mama e/ou de ovário</i>	49
3.2.2.2 <i>Fatores reprodutivos e hormonais</i>	50
3.2.2.2.1 <i>Gestação e amamentação</i>	50
3.2.2.2.2 <i>Hormônios exógenos</i>	50
3.2.2.2.3 <i>Cirurgias ginecológicas</i>	51
3.2.2.3 <i>Dieta alimentar</i>	52
3.2.2.4 <i>Obesidade</i>	52
3.2.2.5 <i>Endometriose</i>	52
3.2.2.6 <i>Outros fatores</i>	53
3.2.3 Classificação dos carcinomas ovarianos	53
3.2.3.1 <i>Classificação histológica</i>	53
3.2.4 Diagnóstico e prevenção	56
3.2.5 Fatores prognósticos	57
3.2.6 Tratamento	58
3.3 GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA E DE OVÁRIO	59
3.3.1 Mutações em genes de predisposição genética	59
3.3.2 Polimorfismos em genes de suscetibilidade	62
3.3.2.1 <i>Polimorfismos em enzimas envolvidas na síntese do estrogênio</i>	63
63.3.2.2 <i>Polimorfismos em enzimas envolvidas no metabolismo do estrogênio</i>	67
3.3.2.3 <i>Polimorfismos em marcadores do tipo STR</i>	70
3.3.2.3.1 <i>Polimorfismos nos ERα, ERβ e AR</i>	73
4 REFERÊNCIAS	76
5 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE	87
5.1 MANUSCRITO 1	87
5.2 MANUSCRITO 2	94
5.3 MANUSCRITO 3	101
5.4 MANUSCRITO 4	113
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	140
6.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO	140

6.2 ANÁLISE DE MARCADORES DO TIPO STR.....	141
6.3 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS EM GSTP1 E CYP17.....	142
6.4 ANÁLISE DA COMBINAÇÃO DE MSI/LOH NOS MARCADORES DO TIPO STR E POLIMORFISMOS NOS GENES GSTP1 E CYP17	143
ANEXO	144
APÊNDICE.....	145

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia maligna de maior incidência na população feminina e a principal causa de morte por câncer nas mulheres (YOULDEN et al., 2012), enquanto o câncer de ovário é o câncer do aparelho reprodutor feminino mais difícil de ser diagnosticado, sendo o câncer ginecológico de maior letalidade na população do sexo feminino (HUAN et al., 2008; MURPHY; WENTZENSEN, 2011), embora seja menos frequente que o câncer de colo do útero.

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. Nos países desenvolvidos, estima-se que a sobrevida média geral, após cinco anos, seja de 85%, enquanto nos países em desenvolvimento, a sobrevida seja de, aproximadamente, 60% (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

A alta mortalidade ocasionada pelo câncer de ovário é, por sua vez, atribuída à falta de estratégias de *screening* efetivas e à ausência de sintomas clínicos na fase inicial. Muitas pacientes apresentam a doença em um estágio avançado, onde a sobrevida é inferior a 30%. No entanto, se a doença fosse detectada em estágios iniciais, a sobrevida de cinco anos aumentaria para, aproximadamente, 90% (HICKEY et al., 1999; HUAN et al., 2008; PAL; PERMUTH-WEY; SELLERS, 2008). Entre os métodos de *screening* atuais para esta neoplasia, incluem-se os marcadores sorológicos tumorais como o CA125. Estes marcadores apresentam baixa especificidade e a seleção de pacientes de alto risco através dessa técnica não é eficiente, tornando-se pouco confiável para o diagnóstico inicial (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, acesso em 20 set. 2012).

A etiologia dos cânceres de mama e de ovário é complexa e a interação de fatores genéticos, hormonais e ambientais parece contribuir para a gênese e progressão dessas doenças. Mutações germinativas em genes de predisposição genética, como os genes BRCA1 e 2, parecem conferir um alto risco para o desenvolvimento do cânceres mamários e ovarianos. No entanto, estes genes são responsáveis pela maioria dos casos hereditários, os quais representam apenas 5-10% dos casos de câncer de mama e até 15% dos casos de câncer de ovário (KIM

et al., 2005; LYNCH et al., 2009; RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012).

A maioria dos casos de cânceres mamários e ovarianos é esporádica e parece estar associada a polimorfismo em genes de suscetibilidade, os quais estão envolvidos em uma grande variedade de funções que incluem metabolismo de hormônio esteroide e detoxificação de carcinógenos ambientais (MIYOSHI; NOGUCHI, 2003).

Particularmente, SNPs e polimorfismos em regiões do tipo STR relacionados ao metabolismo e biossíntese de esteroides têm recebido uma especial atenção nos estudos sobre os cânceres de mama e de ovário, visto que essas neoplasias são doenças de base hormonal.

O estrogênio é um dos hormônios com especial importância nos cânceres mamários e ovarianos, pois parece ter uma forte influência na carcinogênese dessas neoplasias (KIM et al., 2009; LURIE et al., 2009), induzindo alterações genéticas importantes na células (RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012).

As enzimas CYP11, CYP17 e CYP19, assim como enzimas de fase I e II, desempenham um importante papel na biossíntese e metabolização do estrogênio, e SNPs e polimorfismos em marcadores do tipo STR distribuídos nos genes codificadores de tais enzimas poderiam afetar os níveis de estrogênio nas células e de seus metabólitos potencialmente carcinogênicos, influenciando o risco do câncer de mama e de ovário (DELORT et al., 2008; TORRESAN et al., 2008).

A análise de polimorfismos em marcadores do tipo STR permite identificar a ocorrência de MSI e LOH. Estes dois eventos são frequentemente observados em muitos tipos de cânceres e têm sido constantemente analisados nos tumores com o intuito de se verificar os seus potenciais usos no diagnóstico, prognóstico, previsão de resposta ao tratamento, assim como na caracterização da biologia tumoral.

Nos tumores da mama e do ovário a frequência destes dois eventos é variável, e tal variação pode ser decorrente de diferenças no estadiamento dos tumores e no número e tipo de marcadores utilizados para análise (MURATA et al., 2002; PAL et al., 200; SOOD et al., 2001).

Considerando as informações apresentadas, este trabalho objetivou analisar a presença de MSI/LOH em marcadores do tipo STR e SNPs em amostras de câncer de mama e de ovário de pacientes residentes no estado do Espírito

Santo, com o intuito de correlacionar as alterações observadas nos marcadores com parâmetros clínicos e histopatológicos dessas neoplasias, e assim identificar possíveis marcadores relacionados ao câncer de mama e de ovário. Visto que os carcinomas da mama e do ovário são doenças de base hormonal, entre os marcadores selecionados para análise, encontram-se genes relacionados à biossíntese e metabolismo de esteroides, uma vez que alterações em tais genes podem alterar os níveis hormonais e de seus metabólitos carcinogênicos, influenciando a tumorigênese mamária e ovariana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Definir marcadores correlacionados com os cânceres de mama e de ovário por meio da análise de MSI/LOH em marcadores do tipo STR e SNPs em genes de suscetibilidade genética.

2.1.1 Objetivos específicos

- Realizar caracterização epidemiológica dos tumores da mama e do ovário no Espírito Santo, por meio da análise dos livros de registros dos Serviços de Patologia de dois hospitais referência em oncologia no estado do Espírito Santo.
- Determinar a frequência de MSI e de LOH em 12 marcadores do tipo STR, a saber: CYP11, CYP19, UGT1A1, AR, ER α , ER β (relacionados ao hormônio esteroide), D5S346, D17S250 (relacionados à síndrome de Lynch) e D10S197, D8S135, D3S1611 e D2S119.
- Verificar se MSI, LOH ou ambos estão igualmente distribuídos em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos.
- Analisar a combinação de marcadores do tipo STR por parâmetros clínicos e histopatológicos, avaliando a significância estatística.
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos A313G em GSTP1 e T27C em CYP17 nas pacientes com câncer de mama e de ovário e no grupo controle, avaliando a significância estatística na distribuição alélica e genotípica entre os grupos.
- Verificar se as frequências genotípicas dos polimorfismos A313G em GSTP1 e T27C em CYP17 nas pacientes estão igualmente distribuídas em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos.
- Analisar a combinação de marcadores do tipo STR com os genótipos dos polimorfismos A313G em GSTP1 e T27C em CYP17 nas pacientes por parâmetros clínicos e histopatológicos, avaliando se a presença de MSI+LOH associado a algum genótipo em particular apresenta significância estatística.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER DE MAMA

3.1.1 Epidemiologia

O câncer de mama é o tumor maligno mais prevalente na população feminina, sendo responsável por um a quatro casos de câncer que acometem as mulheres. Mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas a cada ano com essa doença e as taxas de incidência ainda estão aumentando em muitos países (ASHTON-PROLLA et al., 2009).

As maiores incidências do câncer de mama são registradas na Europa do Norte e Ocidental, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia, e em muitos países da América do Sul, notavelmente Uruguai e Argentina, enquanto as menores incidências podem ser observadas na África Oriental, África Central e países asiáticos (DIKSHIT et al., 2012; YOULDEN et al., 2012) (figura 1).

Na Europa, o câncer de mama é a principal causa de morte por câncer na população feminina de faixa etária entre 35 e 55 anos, sendo em Portugal a doença que apresenta as maiores taxas de incidência e mortalidade entre as enfermidades que afetam as mulheres (RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012).

Nos Estados Unidos (EUA) são esperados 226.870 novos casos de câncer de mama invasivo na população feminina no ano de 2012 e 2.190 casos na população masculina. O câncer de mama ocupa nos EUA o segundo lugar como causa de morte por câncer em mulheres; o câncer de pulmão ocupa a primeira posição. De 39.920 mortes esperadas ocorrer por câncer de mama na população dos EUA em 2012, 39.510 são esperadas em mulheres e 410 em homens (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Em países das regiões leste e sudeste da Ásia, as taxas de incidência do câncer de mama são quatro a cinco vezes menores em relação às incidências observadas em países localizados na parte norte e ocidental da Europa e na América do Norte (TROIISI et al., 2012). Em países asiáticos, as taxas de incidência são de 27/100.000 mulheres (JIAO et al., 2010). Apesar de uma menor incidência na Ásia, o número de casos de câncer de mama na China tem aumentado anualmente

e esta malignidade tem se tornado o câncer mais comum na população feminina (LIU et al., 2009).

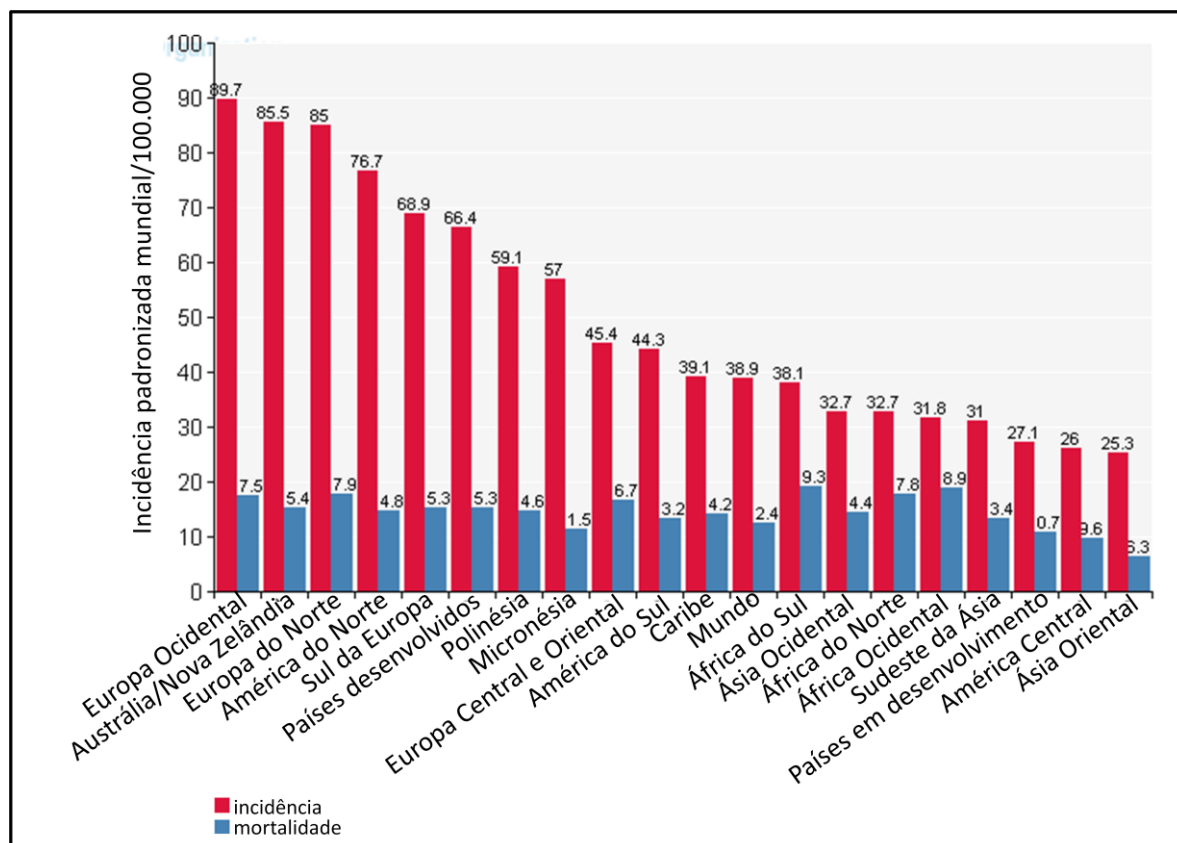


Figura 1 - Taxas de incidência e de mortalidade por câncer de mama na população feminina para o ano de 2008 segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).

Fonte: World Health Organization/GLOBOCAN 2008 (acesso em 15 set. 2012).

No Brasil, o câncer de mama também se apresenta como o câncer que mais acomete a população do sexo feminino (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011), e as taxas de mortalidade por esta neoplasia ainda continuam elevadas no país, provavelmente devido ao diagnóstico ainda em estágios avançados (TORRESAN et al., 2008), o que diminui as possibilidades de cura da paciente (BUIRAGO; UEMURA; SENA, 2011).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (2011) são esperados para o ano de 2012, 52.680 novos casos e um risco estimado de 52 casos por 100.000 mulheres. A região Sudeste é o local de maior incidência desta neoplasia entre a população feminina, com um risco estimado de 69

novos casos por 100 mil, sendo alguns estados que compreendem esta região uns dos que apresentam as maiores taxas de incidência de câncer de mama do país: o Rio de Janeiro ocupa a primeira posição entre os estados com maior incidência (94,93/100.000), enquanto o estado de São Paulo ocupa a terceira posição (71,77/100.000). O estado do Espírito Santo, também localizado na região Sudeste, apresenta uma taxa estimada de 49,2 casos por 100.000 mulheres para o ano de 2012, e a capital do estado, Vitória, apresenta uma taxa de 71,28 casos por 100.000.

As incidências do câncer de mama por regiões brasileiras e por seus respectivos estados foram apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Estimativa para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes para o câncer de mama nas regiões e estados brasileiros segundo o INCA.

Região	Taxa bruta	Estados	Taxa bruta (continua)
Sudeste	68,93	Rio de Janeiro	94,93
		São Paulo	71,77
		Minas Gerais	45,04
		Espírito Santo	49,42
Sul	64,80	Paraná	55,83
		Rio Grande do Sul	81,07
		Santa Catarina	51,38
Centro-Oeste	47,56	Distrito Federal	61,26
		Goiás	42,56
		Mato Grosso	34,48
		Mato Grosso do Sul	60,55
Nordeste	31,90	Alagoas	26,21
		Bahia	27,64
		Ceará	39,11
		Maranhão	13,97
		Paraíba	32,41
		Pernambuco	46,88
		Piauí	24,89

Região	Taxa bruta	Estados	Taxa bruta (conclusão)
		Rio Grande do Norte	35,34
		Sergipe	34,95
Norte	19,38	Acre	10,68
		Amapá	10,45
		Amazonas	19,39
		Pará	19,29
		Rondônia	24,52
		Roraima	17,26
		Tocantins	23,98

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2011).

A variação observada nas taxas de incidência do câncer de mama entre os vários países presume ser decorrente de diferenças no estilo de vida das populações. Essa teoria é corroborada por estudos que demonstram um aumento na incidência do câncer de mama em populações que migraram de uma região de baixo risco para outra de alto risco. Ademais, a baixa incidência do câncer de mama observada em países menos desenvolvidos pode ser em parte devido à ausência de programas de saúde mais modernos e organizados, exacerbado pela ausência de um sistema de registro de câncer, ocasionando o não diagnóstico e a não computação de muitos casos de câncer de mama (YOULDEN et al., 2012).

3.1.2 Fatores de risco

O câncer de mama é uma doença multifatorial, e fatores de risco de natureza genética e não-genética, os quais incluem fatores reprodutivos, hormonais, ambientais, hábitos e estilo de vida, interação entre si, contribuindo para a patogênese e progressão do câncer de mama (AMORIM et al., 2002; ANTOGNELLI et al., 2009) (figura 2).

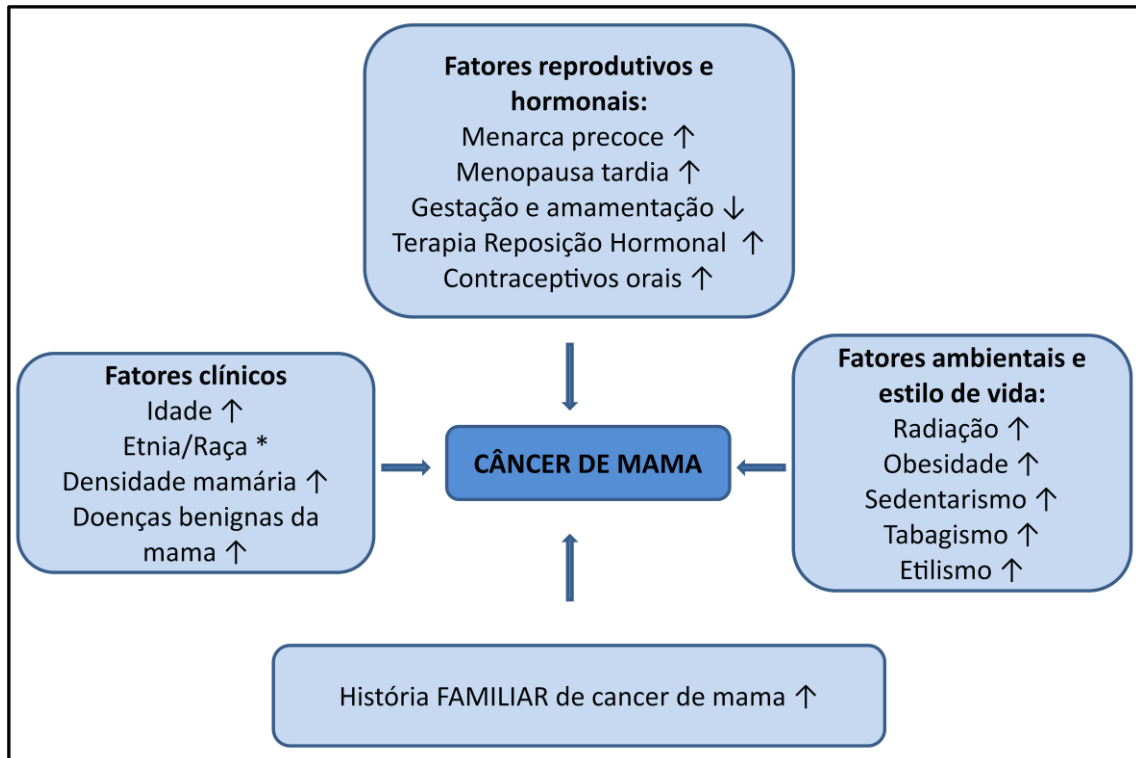


Figura 2 - Fatores associados com aumento (↑) ou diminuição (↓) do risco do câncer de mama em mulheres.

*A incidência varia entre os diferentes grupos étnicos e raciais.

3.1.2.1 *História familiar de câncer de mama*

Entre todos os fatores de risco associados ao câncer de mama, a história familiar é o mais bem estabelecido. O risco para o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres que apresentam um parente de primeiro grau (mãe, pai, irmã, irmão, filha) com esta doença é 1,8 vezes maior em relação a mulheres sem história familiar positiva, sendo o risco 3 vezes maior para mulheres com dois parentes apresentando câncer de mama e, aproximadamente, 4 vezes maior para mulheres que apresentam três ou mais parentes com casos da doença. O risco também aumenta quanto menor for a idade de diagnóstico do carcinoma mamário nos parentes de primeiro grau (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

No entanto, o câncer de mama de caráter hereditário corresponde a, aproximadamente, 5 a 10% de todos os casos e é atribuído a mutações germinativas em um dos genes de predisposição para esta doença, como BRCA1 e BRCA2 (PALMERO et al., 2007).

3.1.2.2 Idade e sexo

A incidência e as taxas de morte por câncer de mama, geralmente, aumentam com a idade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011). Em países industrializados, o risco para o desenvolvimento do câncer mamário depois dos 65 anos é 5,8 vezes maior em relação a mulheres com idade inferior aos 65 anos e 150 vezes maior em relação a mulheres com menos de 30 anos de idade (IMYANITOV; HANSON, 2004). Globalmente, 89% dos casos de câncer de mama são diagnosticados a partir dos 40 anos de idade (YOULDEN et al., 2012), e a incidência dessa doença em mulheres com idade menor ou igual a 25 anos é de menos de 10 casos por 100.000 mulheres (OLDENBURG et al., 2007).

Apesar da menor incidência em mulheres jovens (com idade ≤ 35 anos), o câncer de mama em tal grupo apresenta-se, geralmente, relacionado a um pior prognóstico com tumores maiores, indiferenciados e apresentando maior número de metástase (YOULDEN et al., 2012).

Em relação ao sexo, a incidência do câncer de mama nos indivíduos masculinos é inferior à incidência observada na população feminina. Aproximadamente, um entre 150 casos diagnosticados de câncer de mama ocorrem em homens (OLDENBURG et al., 2007).

3.1.2.3 Etnia/raça

A incidência e a mortalidade por câncer de mama variam consideravelmente entre os diferentes grupos étnicos e raciais. Segundo a *American Cancer Society* (2011), nos EUA, a taxa de incidência do câncer de mama é maior entre caucasoides (mulheres brancas não hispânicas) e afro-americanas, intermediária entre hispânicas e ameríndias, e menor entre as asiáticas.

As taxas de incidência são 20-40% mais elevadas em mulheres brancas não hispânicas em relação às mulheres negras; no entanto as mulheres afro-americanas têm as maiores taxas de incidência antes dos 40 anos e têm uma maior probabilidade de morrer de câncer de mama em todas as idades (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011; OLDENBURG et al., 2007).

3.1.2.4 Fatores reprodutivos e hormonais

A exposição a hormônios sexuais tem sido consistentemente identificada como fator de risco para o câncer de mama. Ainda não foram identificados o (s) hormônio (s) ou combinação específica de hormônios responsáveis pela iniciação do câncer de mama, mas acredita-se que o estrogênio seja um fator importante na modificação do risco para o câncer mamário (OLDENBURG et al., 2007).

Várias variáveis parecem influenciar a exposição, durante o tempo de vida, aos hormônios sexuais endógenos e são elas a idade da menarca, idade da menopausa, idade da primeira gestação a termo (em média uma gestação de 40 semanas ou 280 dias) e número de gestações (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

3.1.2.4.1 Menarca e menopausa

A idade de início da menarca < 12 anos de idade e o início tardio da menopausa (> 55 anos) têm sido associadas com um aumento no risco para o câncer de mama, provavelmente devido à exposição prolongada do epitélio mamário a estrógenos durante vários anos (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003; OLDENBURG et al., 2007).

Mulheres com menarca antes dos 12 anos de idade apresentam aumento no risco para o câncer de mama em 10-20% em relação ao início após os 14 anos de idade, enquanto a cada ano de retardo da menopausa, aumenta-se em 3% o risco para desenvolvimento do câncer de mama (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003; OLDENBURG et al., 2007)

3.1.2.4.2 Gestação e amamentação

O maior número de filhos e idade precoce da primeira gravidez são alguns fatores associados ao menor risco do câncer de mama. Mulheres que tiveram a primeira gestação antes dos 20 anos de idade apresentam metade do risco para o câncer de mama comparado a mulheres que tiveram a primeira gestação depois dos 30 anos (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

Igualmente, a amamentação tem demonstrado uma diminuição no risco para o desenvolvimento do câncer mamário, com os melhores índices sendo observados em mulheres que amamentaram por períodos maiores (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

3.1.2.4.3 *Hormônios exógenos*

A Terapia de Reposição Hormonal (TRH), apesar de se eficaz no alívio, em curto prazo, dos sintomas da menopausa, é associada com aumento no risco do câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas que fazem seu uso por longos períodos (MARIE-GENICA CONSORTIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY FOR MENOPAUSAL HORMONE THERAPY RELATED BREAST CANCER RISK, 2010). Um aumento de 35% no risco para o câncer de mama foi observado para as mulheres que usaram TRH por 5 anos ou mais (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

O risco parece ainda ser influenciado pelo modelo de terapia utilizado, sendo as terapias compostas por estrogênio e progestina demonstrando maior risco de câncer de mama em relação às monoterapias de estrogênio (MARIE-GENICA CONSORTIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY FOR MENOPAUSAL HORMONE THERAPY RELATED BREAST CANCER RISK, 2010).

Apesar dos riscos que a TRH pode apresentar para o desenvolvimento do câncer de mama, ela apresenta um significativo benefício sob o risco de desenvolvimento de outras doenças crônicas, e a proporção risco/benefício da utilização da TRH deve ser avaliada cuidadosamente (FEIGELSON; HENDERSON, 2000).

O uso dos contraceptivos orais (pílulas) e sua associação com o risco de desenvolvimento do câncer mamário apresenta resultados conflitantes (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003). Alguns estudos têm postulado a existência de um risco levemente aumentado para usuárias das pílulas (OLDENBURG et al., 2007), o qual parece desaparecer após 10 anos da cessação da utilização (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

3.1.2.5 Obesidade e sedentarismo

A obesidade e o sedentarismo têm sido associados a altas taxas de câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas e à piores prognósticos entre as pacientes acometidas por essa doença, aumentando as sugestões de que a perda de peso, associado ao aumento da atividade física, reduzem o risco do câncer de mama ou sua recorrência (NELSON, 2012).

Em um estudo realizado na Suécia, 42% das mulheres submetidas à cirurgia bariátrica apresentaram uma redução no risco para o câncer de mama, sendo que 31,9% apresentaram menor peso que os indivíduos controles. A perda de 20 libras (aproximadamente 10 Kg) foi associada com uma redução de 19% na incidência do câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas de Iowa (Estados Unidos), enquanto a perda de 22 libras (aproximadamente 11 Kg) foi associada com uma redução de 57% no risco de câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas em um estudo com enfermeiras (NELSON, 2012).

A hipótese mais aceita para a obesidade ser considerada um fator de risco para o câncer de mama é o aumento de esteroides sexuais circulantes devido a maior conversão periférica de androstenediona em estrona no tecido subcutâneo (FRASSON et al., 2011).

Em relação à atividade física, foi observado, em um estudo australiano, que mulheres que se exercitavam apresentavam 20 a 30% menos risco de câncer de mama que mulheres sedentárias, e que 2 a 3 horas de caminhada rápida por semana reduziu a recorrência de câncer de mama e de todos os fatores de mortalidade em 40 a 67% (NELSON, 2012).

3.1.2.6 Densidade mamária

A densidade mamária é um indicador mamográfico da quantidade de tecido glandular em relação ao tecido adiposo na mama, e pode ser influenciada por fatores genéticos hereditáveis, diminuindo com a idade, gravidez e menopausa (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

Mulheres que apresentam mais de 75% de aumento na densidade da mama na mamografia têm um risco, aproximadamente, cinco vezes maior de

desenvolver câncer de mama em relação a mulheres cujo aumento na densidade mamária for menor que 5% (ERIKSSON et al., 2012; OLDENBURG et al., 2007).

3.1.2.7 Doenças benignas da mama

Em relação às doenças benignas da mama, mulheres apresentando lesões proliferativas sem atipia (lesões com crescimento excessivo de células normais nos ductos e lóbulos mamários) têm demonstrado um aumento de 1,5 a 2 vezes mais chances para o câncer de mama, enquanto mulheres apresentando lesões proliferativas com atipia (lesões com excessivo crescimento de células anormais nos ductos ou lóbulos do tecido mamário) são associadas com um aumento de 4 a 5 vezes mais chances para o desenvolvimento do câncer mamário (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011; OLDENBURG et al., 2007)

3.1.2.8 Radiação

A exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, também é considerada um fator de risco, particularmente durante a puberdade (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011). A associação entre a radiação e o câncer de mama tem sido demonstrada em estudos com sobreviventes de bombas atômicas e com mulheres que fizeram uso de terapia com altas doses de radiação no tórax, particularmente aquelas que foram expostas em idades mais jovens. Entre os sobreviventes de bombas atômicas, o risco para o câncer de mama foi maior em mulheres expostas à radiação durante a adolescência (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

3.1.2.9 Etilismo

Numerosos estudos têm confirmado que o consumo de álcool aumenta o risco de câncer de mama em mulheres e que o risco é dose-dependente e existe independentemente do tipo de bebida alcoólica consumida. Mulheres que

consomem dois drinques por dia ou 24g de álcool apresentam um aumento de 21% no risco para o câncer de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

Um dos mecanismos mais prováveis pelos quais o álcool aumenta o risco de câncer mamário é o aumento dos níveis de estrogênio e androgênio no soro (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011; SEITZ et al., 2012).

3.1.2.10 Tabagismo

O tabagismo é uma das principais fontes de exposição aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). Apesar da fumaça do cigarro não ter demonstrado risco associado ao câncer de mama, alguns estudos têm suportado a hipótese da participação de PAH na carcinogênese mamária. PAH tem sido capaz de induzir tumores em roedores e adutos de PAH têm sido observados no DNA de células cancerosas da mama humana, mas não no DNA de mulheres saudáveis (AMORIM et al., 2002)

3.1.3 Classificação dos carcinomas mamários

3.1.3.1 Classificação histológica

Os carcinomas da mama são classificados, quanto a localização e extensão, em dois grandes grupos: carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo, que, inicialmente, foram divididos em ductal ou lobular, pois se acreditava que tinham origens distintas. Entretanto, sabe-se que ambos os tipos ductal e lobular se originam na unidade terminal ductolobular (UTDL) da mama (esquematizada na figura 3) e os critérios que permitem a distinção entre esses dois grupos parecem estar relacionados com a diferenciação do que com a origem dos tumores (FILHO, 2011; KUMAR et al. 2010).

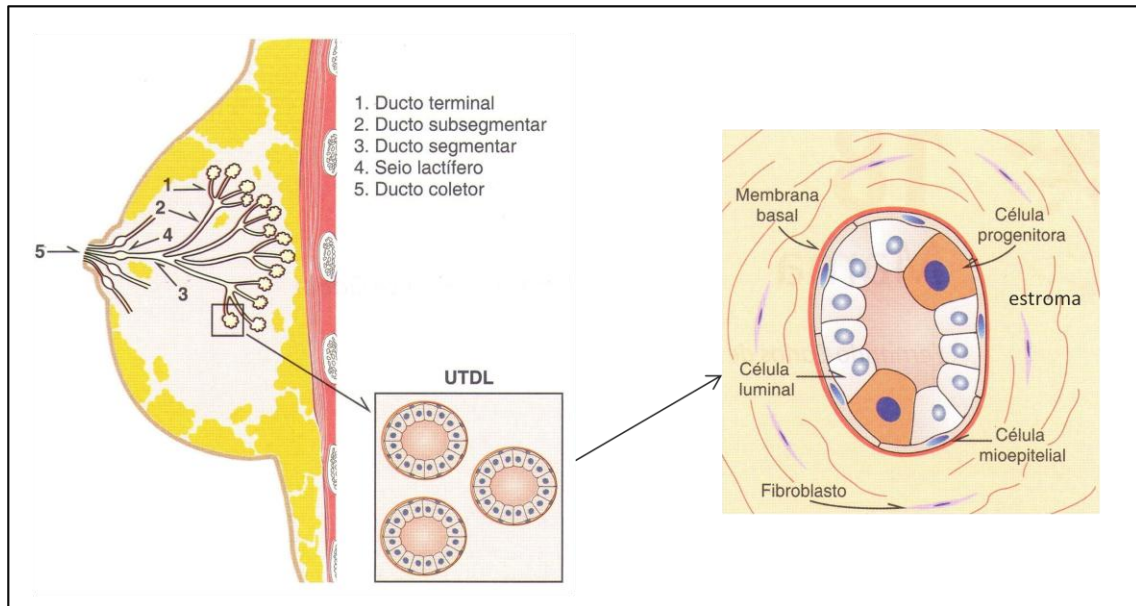


Figura 3 - Esquemática da microanatomia da mama: representação da unidade terminal ductolobular.

Fonte: figura adaptada de Filho (2011).

O carcinoma *in situ* é definido com uma proliferação de células epiteliais malignas limitadas aos ductos e lóbulos da mama pela membrana basal, sem evidências de invasão estromal. Os carcinomas invasivos da mama, por sua vez, são considerados aqueles onde as células tumorais invadem os tecidos adjacentes, penetrando a membrana basal para o estroma, apresentando, assim, potencial de metastatizar para sítios anatômicos distantes (FILHO, 2011; FRASSON et al., 2011; KUMAR et al., 2010).

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é consideravelmente mais comum que o carcinoma lobular *in situ* e engloba um grupo heterogêneo de tumores. Observações histológicas e estudos moleculares indicam que 10-30% de CDIS puro progridem para carcinoma ductal invasivo, sugerindo que o CDIS seja precursor do tipo invasivo do carcinoma mamário (SHEN et al., 2000).

Os carcinomas invasivos (infiltrantes) da mama, similar aos CDIS, são um grupo heterogêneo de tumores diferenciados em subtipos histológicos. O carcinoma ductal infiltrante sem outra especificação (SOE) e o lobular são os principais tipos histológicos e são responsáveis por aproximadamente 75% e 15%, respectivamente, de todos os casos de carcinoma mamário nos EUA. Os tipos histológicos raros que

incluem carcinoma mucinoso, tubular, inflamatório e medular são responsáveis, juntos, por 10% de todos os casos (LI; URIBE; DALING, 2005).

Os principais tipos histológicos do carcinoma da mama de acordo com a OMS estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Classificação histológica dos carcinomas da mama segundo a OMS (2003).

<i>In situ</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Lobular • Ductal <ul style="list-style-type: none"> - Comedocarcinoma - Cribiforme - Micropapilar - Papilar - Sólido
Invasivo
<ul style="list-style-type: none"> • Lobular • Ductal Sem outras Especificações (SOE) • Tubular • Medular • Mucinoso • Apócrino • Metaplásico • Secretor • Papilar • Cribiforme • Micropapilar • Inflamatório

Fonte: Malhotra e outros (2010) e Tavassoli e Devilee (2003).

3.1.3.2 Classificação molecular

O advento da tecnologia de microarranjos de DNA permitiu a análise do perfil de expressão gênica dos tumores da mama e definiu o câncer de mama em cinco subgrupos com diferentes prognósticos, conhecidos como os subtipos de Sorlie-Perou (ERIKSSON et al, 2012). Segundo essa classificação os tumores podem ser definidos como: luminal A e luminal B, basaloide, HER2 e tipo mama normal (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2003). Mais recentemente, outro subtipo foi descoberto, denominado *claudin-low* (CIRQUEIRA et al., 2011; MALHOTRA et al., 2010).

Na prática clínica, painéis imunoistoquímicos têm sido propostos para a identificação desses subtipos moleculares por meio da expressão de RE, RP e da proteína HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2*) (CIRQUEIRA et al., 2011).

Os tumores basoloides são tipicamente negativos para RE, RP e para o produto proteico do HER2; a negatividade para esses três marcadores denomina-os triplo-negativos. O subtipo basaloide, assim como o subtipo HER2, tem sido associado com pior prognóstico, além de estar ainda relacionado à mutação no gene BRCA1. Outros marcadores comumente expressos neste subtipo molecular são citoqueratinas basais 5/6, 14 e 17, P-caderina e o fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1) (CARVALHO et al., 2010; FRASSON et al., 2011).

O subtipo luminal A são RE positivos e HER2 negativos enquanto o luminal B são RE e HER2 positivos. Os tumores HER2 são RE negativo e HER2 positivo, sendo a expressão de marcadores basais neste grupo variável por ensaios imunoistoquímicos (CARVALHO et al., 2010). O subtipo mama normal apresenta a expressão de genes de tecido adiposo e de outros tipos celulares não epiteliais, forte expressão de genes do epitelial basal e baixa expressão de genes do epitélio luminal. No entanto, ainda não está determinado se este subtipo é um grupo distinto ou representa um tecido mal analisado (ERIKSSON et al., 2012).

Apesar de alguns tumores luminal B serem identificados por apresentarem expressão de HER2, a principal distinção biológica entre luminal A e B é a expressão aumentada de alguns genes, que incluem CCNB1, MKI67 (que codifica a proteína Ki-67) e MYBL2, nos tumores do subtipo luminal B (CHEANG et al., 2009). Assim foi, recentemente, incluída à imunoistoquímica, a análise do

marcador Ki-67 em conjunto com os marcadores já analisados RE, RP e HER2 para distinção dos subtipos luminal A e B, apresentando o subtipo luminal A índice de Ki-67 inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (CIRQUEIRA et al., 2011).

A distinção do subtipo luminal B possibilita a identificação de um grupo de pior prognóstico e que apresenta resistência ao tratamento com hormonioterapia, possibilitando a tais pacientes uma terapia sistêmica adicional àquela propiciada ao grupo de bom prognóstico dos tumores que são positivos para os receptores hormonais (CHEANG et al., 2009).

O subtipo *claudin-low*, recentemente identificado, é caracterizado por uma baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares ocludentes e glicoproteínas de adesão célula-célula, incluindo as claudinas 3, 4 e 7, as ocludinas e a E-caderina. Apresenta aumento na expressão de marcadores de transição epitélio-mesênquima, de marcadores endoteliais e linfocíticos e de marcadores relacionados a células tronco tumorais com fenótipo CD44+/CD24-. No entanto, não possui ainda marcadores imunoistoquímicos protocolados para a sua caracterização e nem terapêutica específica (CIRQUEIRA et al., 2011; MALHOTRA et al., 2010).

A classificação dos carcinomas da mama por seus subtipos moleculares pode ser observada na figura 4.

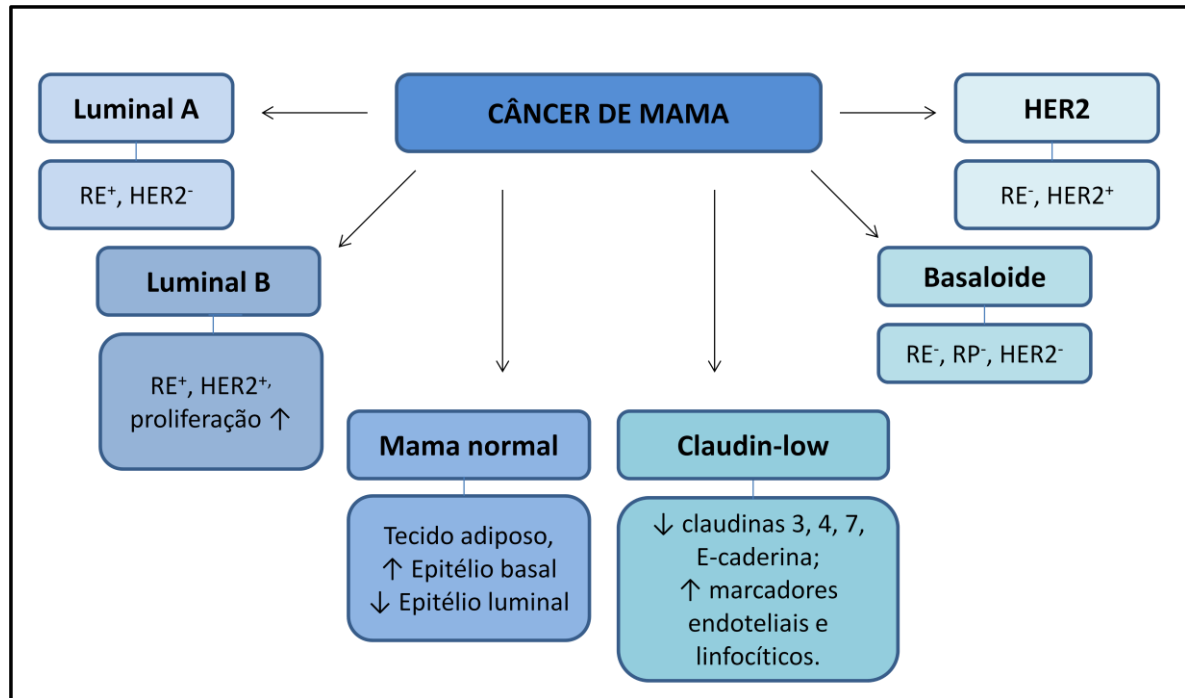


Figura 4 - Classificação molecular do câncer de mama.

↑: alta expressão; ↓: baixa expressão.

3.1.4 Diagnóstico e prevenção

Segundo a *American Cancer Society* (2011), o diagnóstico do carcinoma mamário é realizado por meio de mamografias e exame clínico das mamas, além de ressonância magnética para mulheres com um risco de desenvolvimento de câncer de mama de, aproximadamente, 20 a 25%, começando o rastreio por esta metodologia a partir dos 30 anos. Mulheres com um risco inferior a 15% para o câncer mamário não são recomendadas a utilizar a ressonância como método de rastreio.

Para mulheres assintomáticas de 20 a 30 anos com risco médio para o câncer de mama, a OMS preconiza a realização de exames clínicos das mamas, no mínimo, a cada três anos. Para mulheres com idade ≥ 40 anos, a OMS sugere a exameção clínica das mamas anualmente, atuando como um complemento importante à mamografia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

O rastreamento da população com mamografia e exames físicos (exameção clínica das mamas) são responsáveis por 10-40% dos casos de câncer de mama detectados precocemente (ZHU et al., 2003). A mamografia é um dos métodos mais efetivos disponível para a identificação do câncer de mama em um

estágio mais precoce, muitas vezes, antes de algum sintoma ser detectado por meio da exame física (YOULDEN et al., 2012).

A implementação da mamografia como um método de rastreamento do câncer de mama foi estabelecida por meio de várias triagens randomizadas controladas durante os anos de 1980 e 1990. Um estudo realizado na Suécia foi o primeiro a relatar uma redução de 31% na mortalidade por câncer de mama usando este método de rastreio e estudos posteriores também demonstraram uma redução de 25-30% na mortalidade por câncer de mama (YOULDEN et al., 2012).

A avaliação dos programas de rastreio hoje existentes, usando a mamografia, tem observado uma redução na mortalidade similar à observada nos estudos de triagem inicialmente realizados. Na Austrália, uma redução entre 21% e 28% foi verificada na mortalidade, enquanto na Dinamarca, Inglaterra e País de Gales, Países baixos e Suécia, esse índice variou entre 19% e 32% (YOULDEN et al., 2012).

No Brasil, o exame clínico anual das mamas e o rastreamento são as estratégias recomendadas para controle do câncer da mama. As recomendações do Ministério da Saúde para detecção precoce e diagnóstico desse câncer baseiam-se no *Controle do câncer de mama: documento de consenso*, de 2004, que considera, como principais estratégias de rastreamento, o exame clínico anual das mamas a partir dos 40 anos e um exame mamográfico, a cada dois anos, para mulheres de 50 a 69 anos. Para as mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer da mama (com história familiar de câncer da mama em parentes de primeiro grau antes dos 50 anos de idade; história familiar de câncer da mama bilateral ou de ovário em parentes de primeiro grau em qualquer idade; história familiar de câncer da mama masculina; ou mulheres com diagnóstico histopatológico de lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular *in situ*), recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

3.1.4.1 Quimioprevenção

A quimioprevenção consiste no uso de fármacos para prevenir o desenvolvimento e a progressão de células malignas. É uma possibilidade

alternativa para mulheres consideradas de risco elevado para o desenvolvimento do câncer de mama. O método faz uso de moduladores seletivos de receptores estrogênicos, SERMs, dos quais fazem parte o tamoxifeno e o raloxifeno (FRASSON et al., 2011; ROSAL; DA SILVA, 2011).

O tamoxifeno é um modulador de primeira geração aprovado em 1998 pela FDA (*United States Food and Drug Administration*) com base no estudo NSABP-P-1 (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*) (MIYOSHI; NOGUCHI, 2003). Resultados de estudos de triagem clínica demonstraram uma redução de 49% na incidência de câncer de mama invasivo RE positivo em mulheres consideradas de alto risco e que fizeram uso do tamoxifeno. No entanto, quando utilizado por longos períodos, o tamoxifeno pode induzir atividade proliferativa no endométrio, ocasionando o surgimento de pólipos e eventual carcinoma; o risco de carcinoma endometrial em usuárias do tamoxifeno é estimado ser de 3 a 7 vezes maior do que em não usuárias (ROSAL; DA SILVA, 2011).

O raloxifeno é um modulador de segunda geração com efeitos similares aos do tamoxifeno na redução do risco de câncer de mama invasor sem, no entanto, estimular as células do endométrio como os outros SERMs (LIMA; DA SILVA, 2012; ROSAL; DA SILVA, 2011).

Ambos o tamoxifeno e o raloxifeno exercem seu mecanismo de ação por meio da interação com RE, atuando como agonistas ou antagonistas, de acordo com o tecido alvo. No tecido mamário, esses fármacos exercem efeito anti-estrogênico, bloqueando os receptores hormonais (ROSAL; DA SILVA, 2011). Além disso, o tamoxifeno também pode induzir morte celular programada (SINGH; FRANCIS; MICHAEL, 2011).

A indicação desses fármacos deve ser precedida de criteriosa avaliação sobre o risco de efeitos colaterais da medicação e quantificação do risco de surgimento de câncer (FRASSON et al., 2011).

3.1.5 Fatores prognósticos

Fatores prognósticos são parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico e que servem como preditor da sobrevida do paciente (BUITRAGO; UEMURA; SENA, 2011; MORABITO et al., 2003).

Os fatores prognósticos considerados clássicos e mais correntemente utilizados na prática clínica oncológica para o câncer de mama são o envolvimento dos linfonodos axilares, o tamanho do tumor, o tipo e o grau histológico (ABREU; KOIFAN, 2002).

O conhecimento do envolvimento axilar e do número de linfonodos comprometidos se constitui na mais importante informação prognóstica, e tem se mostrado como o indicador mais importante de sobrevida livre da doença e sobrevida global da mama com câncer (BUIRAGO; UEMURA; SENA, 2011). Pacientes sem comprometimento metastático para linfonodos axilares apresentam um melhor prognóstico tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença; apenas 20% a 30% dos pacientes com nódulo negativo irão desenvolver recidiva no prazo de 10 anos (ABREU; KOIFAN, 2002; BUIRAGO; UEMURA; SENA, 2011; FILHO, 2011).

Em pacientes com axila positiva, o tamanho tumoral é o segundo fator prognóstico mais importante, enquanto em pacientes com axila negativa, o tamanho do tumor constitui-se a variável mais importante a ser analisada e apresenta-se como fator preditivo fundamental para a recorrência da doença (ABREU; KOIFAN, 2002).

Em relação ao tipo histológico, o carcinoma ductal infiltrante, classicamente, apresenta um maior envolvimento linfático e um pior prognóstico a aquele verificado nas pacientes com tipos histológicos menos frequentes de carcinoma invasivo de mama (ABREU; KOIFAN, 2002; FILHO, 2011).

O grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor indicando a sua maior ou menor capacidade de metastatização (ABREU; KOIFAN, 2002). O método de gradação histológica recomendado é o de *Nottingham* (modificação de *Elston-Ellis* do sistema de graduação de *Scarff-Bloom-Richardson*), o qual se baseia na avaliação de padrões morfológicos dos tumores como formação tubular, pleomorfismo nuclear e número de mitoses, cada um deles sendo pontuados com valores de 1 (favorável) a 3 (desfavorável); os escores dos três grupos são somados, adequando os tumores nas seguintes categorias: grau I - bem diferenciado ou baixo grau (3 a 5 pontos de escore combinado); grau II - moderadamente diferenciado ou grau intermediário (6 a 7 pontos de escore combinado) e grau III - pouco diferenciado ou alto grau (8 a 9 ponto de escore combinado) (FRASSON et al., 2011; FILHO et al, 2011).

Alguns fatores prognósticos tem uma dupla função. Além de exercerem seu papel como fator prognóstico, tem um papel muito importante como fator preditivo permitindo, assim, o estabelecimento de terapias específicas para o tratamento do tumor. Os receptores hormonais e a superexpressão da oncoproteína HER2 estão entre esses fatores de dupla função (BUIRAGO; UEMURA; SENA, 2011; MORABITO et al., 2003).

3.1.5.1 Receptores hormonais

Aproximadamente 75% dos casos de câncer de mama expressam o RE, enquanto mais da metade desses tumores também expressam o RP (CUI et al., 2005).

A quantificação de ambos os receptores hormonais é clinicamente relevante na predição à resposta a terapia endócrina com anti-estrogênio (MORABITO et al., 2003). Casos de câncer de mama metastático positivos para os ambos os receptores RE e RP têm uma taxa de resposta à terapia anti-hormonal equivalente a próximo de 80%, enquanto carcinomas mamários positivos para RE, mas negativos para RP têm uma taxa de resposta de aproximadamente 40% (BUIRAGO; UEMURA; SENA, 2011; HIGGINS; STEARNS, 2009).

3.1.5.2 Status da oncoproteína HER2

A expressão aumentada do oncogene HER2 ocorre em aproximadamente 20% de todos os cânceres de mama, e se configura como um indicador de mau prognóstico, com os pacientes HER2 positivos apresentando um alto risco de recidiva precoce (ABREU; KOIFAN, 2002).

Além do valor prognóstico de HER2, a positividade para este marcador possui um grande valor preditivo em relação aos benefícios clínicos a serem obtidos com a utilização de tratamentos específicos (BUIRAGO; UEMURA; SENA, 2011).

A hiperexpressão do HER2 é determinada por imunoistoquímica; casos com positividade 3+, definida como coloração membranosa forte e completa em mais de 30% das células neoplásicas, são indicadores de terapia com anticorpo anti-

HER2, enquanto casos negativos e 1+ não são, em princípio, elegíveis para o tratamento. Casos com positividade 2+ são considerados de resultado indeterminado, devendo ser complementados por métodos moleculares, como hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) (FILHO, 2011).

3.1.6 Tratamento

As modalidades terapêuticas para o câncer de mama são a cirurgia e a radioterapia para tratamento loco-regional e a quimioterapia e a hormonioterapia para tratamento sistêmico. No entanto, o tratamento deve ser ministrado por uma equipe multidisciplinar visando o tratamento integral da paciente (ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA; CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2001).

A escolha da terapia sistêmica adjuvante é baseada na idade do paciente, tamanho do tumor, grau histológico, envolvimento linfonodal, *status* dos receptores hormonais e *status* da oncoproteína HER2 (CHEANG et al., 2009).

Para os casos de câncer de mama RE positivos e ou RP positivos, a terapia endócrina com tamoxifeno ou inibidores da aromatase é indicada. O tamoxifeno adjuvante reduz o risco para o desfecho composto de recidiva ou óbito em pacientes com tumores positivos para receptores hormonais em, aproximadamente, 30% (CHEANG et al., 2009). Os inibidores da aromatase, quando comparados com o tamoxifeno, tem apresentado uma redução no risco de recidiva de, aproximadamente, 13%, no entanto, ainda não tem sido verificada a sua vantagem em relação a sobrevida (SINGH; FRANCIS; MICHAEL, 2011).

O câncer de mama que apresenta hiperexpressão da oncoproteína HER2 é tratado com uma combinação de trastuzumabe (*Herceptin*®), um anticorpo monoclonal alvo da proteína HER2 (CHEANG et al., 2009). As terapias-alvo contra HER2 são muito eficazes, tanto na forma adjuvante, quanto no contexto metastático. O trastuzumabe melhora as taxas de resposta, reduz a progressão da doença e melhora a sobrevida quando utilizado isoladamente ou adicionado à quimioterapia em câncer de mama metastático; o trastuzumabe adjuvante reduz o risco de recorrência à metade e a mortalidade em um terço em pacientes com câncer de mama em estágio primário. O uso do *Lapatinibe*®, outro inibidor da tirosina quinase que bloqueia tanto o HER2 quanto o HER1, beneficia as pacientes nas quais o uso

do trastuzumabe foi ineficaz, controlando a doença metastática (CIRQUEIRA et al., 2011).

3.2 CÂNCER DE OVÁRIO

3.2.1 Epidemiologia

O câncer de ovário constitui-se na malignidade ginecológica mais letal em mulheres decorrente da apresentação clínica vaga, estágios avançados no momento do diagnóstico e baixa sobrevida (KOTSOPOULOS et al., 2012). Em comparação com o câncer de mama, o câncer ovariano é 10 vezes menos comum, sendo, no entanto, associado a um número muito maior de mortes; globalmente, o câncer de ovário é responsável pela morte de mais de 100.000 mulheres por ano, constituindo a quinta causa mais comum de morte por câncer em mulheres no mundo ocidental (PRAT, 2012).

A incidência do câncer de ovário aumenta com a idade, apresentando os maiores valores por volta da oitava década de vida (SCHUIJER; BERNIS, 2003). Um pouco menos de 1% do câncer ovariano epitelial ocorre antes dos 20 anos de idade (HOLSCHNEIDER; BEREK, 2000). Na população geral, a idade média ao diagnóstico é de 63 anos (DERCHAIN; DUARTE-FRANCO; SARIAN, 2009).

Em países desenvolvidos, a taxa de incidência anual para o câncer ovariano é de 10,3 casos por 100.000 mulheres, enquanto em países em desenvolvimento, essa taxa corresponde a 4,9 por 100.000 (ABRÃO, 2006).

Nos EUA e Reino Unido, o carcinoma epitelial do ovário é a principal causa de morte de câncer ginecológico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012; HICKEY et al., 1999). São esperados nos EUA, para o ano de 2012, 15.500 mortes por esta neoplasia e 22.280 novos casos entre as mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). Na Europa, diferentes taxas de mortalidade são relatadas. Na Alemanha e na maioria da Europa Ocidental, a incidência do câncer ovariano é próxima de 12/100.000 mulheres enquanto na Itália e França essa taxa apresenta valores menores e iguais a 9,3 e 9,7, respectivamente. Os países do norte da Europa apresentam as maiores taxas de mortalidade, correspondendo a 13,9 na Noruega e 13,4 no Reino Unido (DANSONKA-MIESZKOWSKA et al., 2006).

As taxas de incidência e mortalidade por câncer de ovário em vários países do mundo encontram-se ilustradas na figura 5.

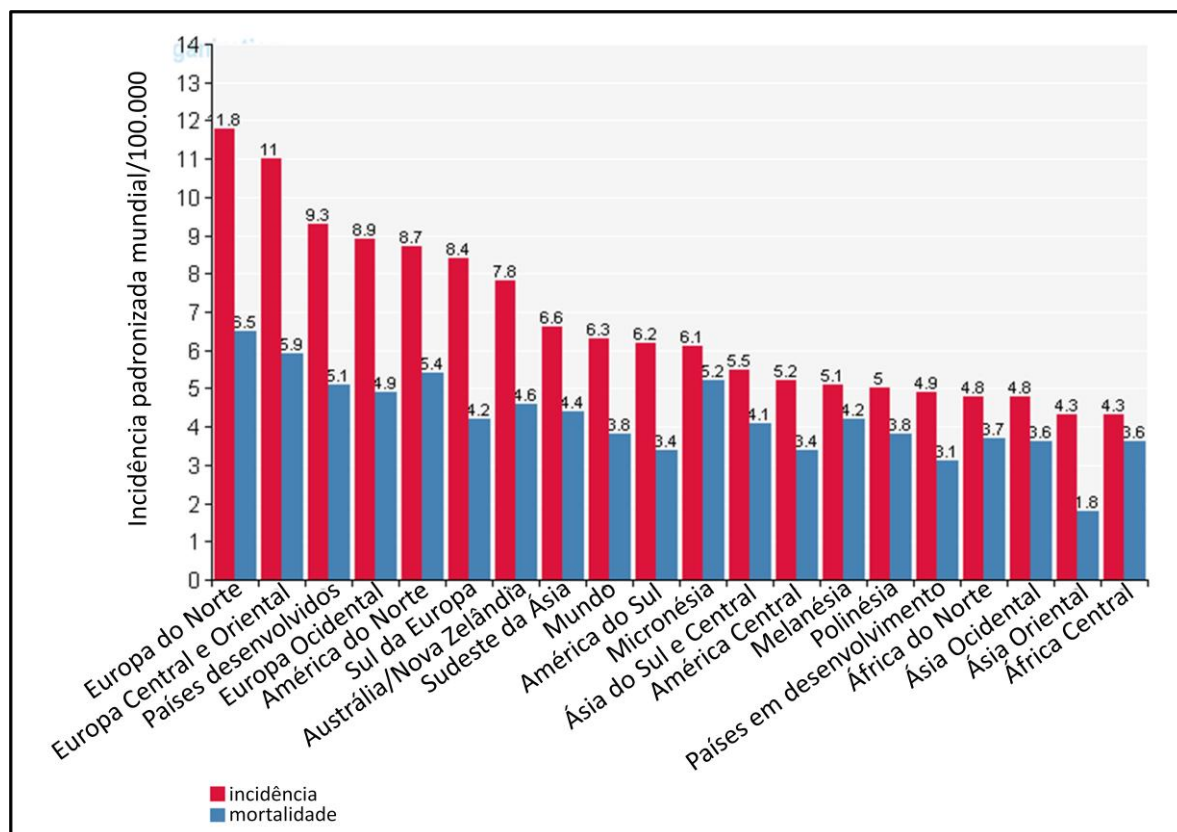


Figura 5 - Taxas de incidência e de mortalidade por câncer de ovário na população feminina para o ano de 2008 segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).

Fonte: World Health Organization/GLOBOCAN 2008 (acesso em 15 set. 2012).

No Brasil, os dados epidemiológicos para o câncer de ovário são em menor número em relação aos dados para o câncer de mama. Somente a partir do ano de 2012, o INCA apresentou dados de incidência próprios para o câncer ovariano, excluindo-o da classificação de outros tumores. Segundo os dados do INCA (2011), são esperados para o ano de 2012, 6 casos de câncer de ovário por 100.000 mulheres no Brasil (6.190 casos por ano).

Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer do ovário é o sétimo mais incidente na maioria das regiões, com um risco estimado de 8 casos novos a cada 100 mil mulheres na região Sul, 7 a cada 100 mil na região Sudeste, 6 por 100 mil na região Centro-Oeste e 4 por 100 mil na região Nordeste, enquanto na

região Norte (2/100 mil), é o oitavo tumor mais frequente (tabela 3) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

O estado do Espírito Santo apresenta uma taxa estimada de 5,92/100.000 e 110 novos casos de câncer ovariano para o ano de 2012, enquanto Vitória apresenta uma taxa de 9,49 casos por 100.000 e 20 novos casos de câncer de ovário (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

Tabela 3 - Estimativa para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes para o câncer de ovário nas regiões e estados brasileiros segundo o INCA.

Região	Taxa bruta	Estados	Taxa bruta (continua)
Sudeste	7,53	Rio de Janeiro	8,90
		São Paulo	7,98
		Minas Gerais	5,72
		Espírito Santo	5,92
Sul	7,70	Paraná	6,80
		Rio Grande do Sul	9,27
		Santa Catarina	6,47
Centro-Oeste	5,85	Distrito Federal	7,31
		Goiás	5,51
		Mato Grosso	4,06
		Mato Grosso do Sul	7,27
Nordeste	4,45	Alagoas	2,44
		Bahia	4,18
		Ceará	5,44
		Maranhão	2,69
		Paraíba	3,94
		Pernambuco	6,23
		Piauí	4,13
		Rio Grande do Norte	3,97
		Sergipe	5,04

Região	Taxa bruta	Estados	Taxa bruta (conclusão)
Norte	2,54	Acre	2,57
		Amapá	1,76
		Amazonas	2,86
		Pará	2,35
		Rondônia	1,83
		Roraima	0,00
		Tocantins	4,12

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2011)

3.2.2 Fatores de risco

A etiologia do câncer de ovário, assim como a do câncer de mama, parece ser multifatorial, e fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento do câncer ovariano incluem fatores genéticos, hormonais e reprodutivos e ambientais (LEVINE; BOYD, 2001; REIS, 2005; SUEBLINVONG; CARNEY, 2009), como pode ser observado na figura 6.

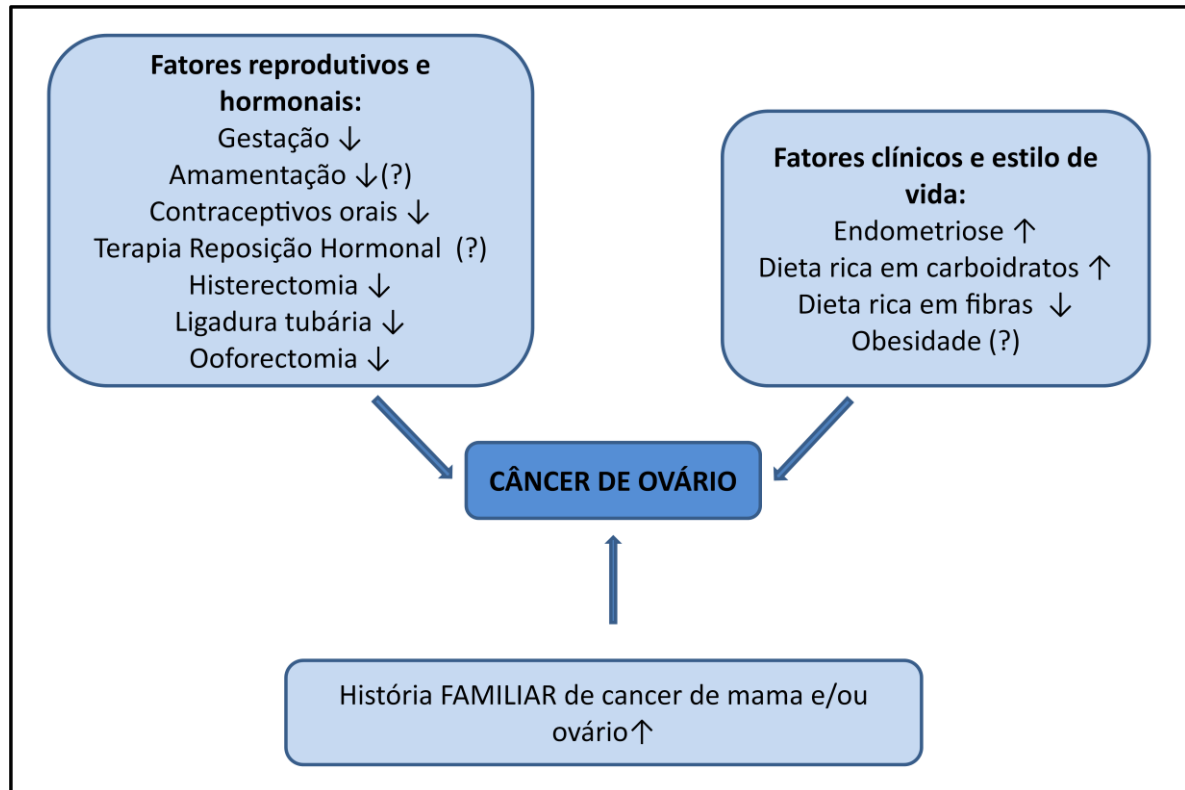


Figura 6 - Fatores associados com aumento (↑) ou diminuição (↓) do risco do câncer de ovário em mulheres.

(?) Variáveis ainda não completamente elucidadas.

3.2.2.1 *História familiar de câncer de mama e/ou de ovário*

A história familiar de câncer da mama ou de ovário constitui-se o fator de risco mais significativo para o desenvolvimento do câncer ovariano apesar de, aproximadamente, até 15% dos casos de câncer de ovário serem hereditários (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011; NUSBAUM; VOGEL; READY, 2006-2007).

Pesquisas informam que o risco de uma mulher desenvolver a doença é de 5% quando há na família parente de primeiro grau com carcinoma ovariano, aumentando o risco para 30% quando há a ocorrência do câncer de ovário em duas ou mais mulheres (LIMA et al., 2009; RISTOW; YAMAMOTO; FÁVARO, 2006). Mulheres que já desenvolveram câncer da mama e são portadoras de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 também apresentam um risco aumentado para desenvolver câncer de ovário (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

3.2.2.2 Fatores reprodutivos e hormonais

Semelhantemente ao câncer de mama, o câncer ovariano também é uma doença de base hormonal, e variáveis que influenciem os níveis de hormônios nos tecidos ovarianos podem apresentar um maior ou menor risco para o desenvolvimento desta neoplasia.

3.2.2.2.1 Gestação e amamentação

A gestação está associada consistentemente com uma redução no risco para o câncer de ovário e acredita-se que este efeito protetor seja decorrente da anovulação e supressão pituitária (SUEBLINVONG; CARNEY, 2009).

A primeira gestação a termo reduz em aproximadamente 40% o risco do câncer de ovário (RISTOW; YAMAMOTO; FÁVARO, 2006) e cada gestação adicional diminui em aproximadamente 15% o risco deste tipo de câncer (SELLERS et al., 2005). Gestações não levadas a termo parecem não proteger contra o carcinoma ovariano como aquelas que são levadas. Contudo, vários autores ainda as consideram como fator protetor (RISTOW; YAMAMOTO; FÁVARO, 2006).

A amamentação, similarmente a sua função protetora para o câncer de mama, também está associada à diminuição do risco carcinogênico no epitélio dos ovários e esse papel protetor parece ser decorrente da sua capacidade de inibir parcialmente a ovulação pela refratariedade aos níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) e de hormônio luteinizante (LH) elevados (RISTOW; YAMAMOTO; FÁVARO, 2006; SUEBLINVONG; CARNEY, 2009). No entanto, como há elevação dos níveis de FSH e LH, teoricamente também há favorecimento da ação estrogênica no tecido do ovário e logo, aumento do risco. Ademais, torna-se difícil avaliar o fator protetor da amamentação isoladamente, uma vez que está relacionada à gestação (RISTOW; YAMAMOTO; FÁVARO, 2006).

3.2.2.2.2 Hormônios exógenos

O uso de contraceptivos orais está associado com uma diminuição no risco para o desenvolvimento de câncer ovariano e postula-se que tal associação seja devido à capacidade dos hormônios existentes nas pílulas de suprimir a ovulação e reduzir a secreção de gonadotrofinas pela pituitária. Uma diminuição em até 50% do risco para o desenvolvimento do câncer de ovário foi conferido em mulheres que fizeram uso das pílulas por um período de cinco anos (RISTOW; YAMAMOTO; FÁVARO, 2006). O efeito protetor dos contraceptivos orais com base somente na redução dos ciclos ovulatórios sugere um papel protetor da progestina, o principal componente das pílulas (HILDEBRAND et al., 2010).

A TRH, por sua vez, apresenta resultados conflitantes em relação a sua associação com o câncer ovariano. O uso apenas do estrogênio nas TRHs tem sido associado com um aumento de 25-50% no risco do câncer de ovário. No entanto, ainda não está claro se a adição de progestina, após 1976 às preparações hormonais na pós-menopausa, poderia suavizar os efeitos prejudiciais do estrogênio nos ovários (HILDEBRAND et al., 2010).

3.2.2.2.3 Cirurgias ginecológicas

O risco de câncer de ovário parece diminuir em torno de 80% em mulheres histerectomizadas ou laqueadas (RISTOW; YAMAMOTO; FÁVARO, 2006). A histerectomia e a ligadura tubária parecem conferir proteção contra o câncer ovariano por desligar o acesso de carcinógenos endógenos e exógenos ao ambiente ovariano via um útero intacto ou tubos falopianos (HILDEBRAND et al., 2010).

A ooforectomia, por sua vez, parece conferir benefícios potenciais à prevenção do câncer de ovário, além de diminuir o risco de câncer de mama e de cirurgia ovariana subsequente (LIMA et al., 2009). Entretanto, a remoção dos ovários não elimina completamente o risco de câncer de ovário, e os efeitos deletérios da ooforectomia em mulheres na pré-menopausa ultrapassam os benefícios. A perda prematura da função ovariana antes da menopausa natural aumenta o risco de doenças cardiovasculares, de deficiências cognitivas e demência, Parkinson, redução do bem-estar psicológico e diminuição da função sexual (DERCHAIN; DUARTE-FRANCO; SARIAN, 2009).

3.2.2.3 Dieta alimentar

Dieta rica em carboidratos acarreta uma hiperinsulinemia crônica, a qual parece aumentar o risco do câncer de ovário. Tal função como fator de risco aparente da hiperinsulinemia postula-se ser decorrente da redução na concentração da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP – *insulin-like growth factor binding protein*), aumentando, conseqüentemente, a biodisponibilidade do fator I de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 – *insulin-like growth factor*). O aumento de IGF-1 reduz a apoptose, estimula a proliferação celular e a síntese de hormônios esteroides e a diminuição na concentração da globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG – *sex hormone-binding globulin*), favorecendo o desenvolvimento do câncer ovariano (NAGLE et al., 2011).

Contrariamente a dieta rica em carboidratos, uma dieta rica em fibras parece ter um efeito protetor para o câncer ovariano uma vez que pode reduzir os níveis de hormônios sexuais endógenos devido ao aumento da SHBG, a qual diminui os níveis de estrogênio livre (NAGLE et al., 2011). No estudo de Hedelin e outros (2011), uma associação inversamente proporcional foi observada entre a alta ingestão de fibras e o risco de tumores ovarianos *borderline*, no entanto, para o carcinoma de ovário invasivo nenhuma associação foi verificada.

3.2.2.4 Obesidade

A obesidade não é um fator de risco consistente para o câncer de ovário, apesar de alguns estudos sugerirem que a distribuição da gordura corporal, em particular o tecido adiposo distribuído na circunferência abdominal, seria um fator de risco para o câncer ovariano (SELLERS et al., 2005).

3.2.2.5 Endometriose

A endometriose é uma doença frequente durante a vida reprodutiva da mulher e é caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina. Essa doença acarreta estado crônico de inflamação, o que pode contribuir

para o desenvolvimento do câncer ovariano. Estudos sugerem que o risco de câncer do ovário dobra em mulheres portadoras de endometriose em comparação com as que não a possuem (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

3.2.2.6 Outros fatores

Aspectos da história reprodutiva e que são associados ao câncer de mama como menarca, idade de início da menopausa e idade da primeira gravidez não são claramente associados com o risco de desenvolvimento de câncer de ovário (SELLERS et al., 2005).

3.2.3 Classificação dos carcinomas ovarianos

3.2.3.1 Classificação histológica

A classificação dos tumores ovarianos preconizada pela OMS separa as neoplasias do ovário de acordo com o tecido de origem mais provável. Segundo essa classificação os tumores ovarianos se originariam de um dos três componentes do ovário: a) epitélio de superfície que deriva do epitélio celômico ou de epitélio endometrial ectópico; b) células germinativas que migram para os ovários a partir do saco vitelino e são totipotentes; c) estroma do ovário. Há ainda um grupo de tumores que foge à classificação, além dos tumores secundários ou metastáticos (FILHO, 2011; KUMAR et al., 2010).

Entre as neoplasias ovarianas malignas, as de origem epitelial são as mais frequentes e são classificadas conforme o tipo celular em: seroso, mucinoso, endometrióide, de células claras, de células transicionais e epiteliais-estromais (FILHO, 2011; KUMAR et al., 2010), como demonstrado na tabela 4.

Recentemente, no entanto, uma nova teoria sobre a origem dos carcinomas epiteliais ovarianos tem surgido. Os novos estudos têm evidenciado que os tumores ovarianos primários originam-se nos órgãos pélvicos e envolvem o ovário secundariamente. Dessa forma, tem sido proposto que os tumores serosos são decorrentes da implantação do epitélio (benigno ou maligno) das tubas uterinas; o

carcinoma endometriode e de células claras têm sido associados à endometriose, a qual é considerada precursora destes tumores, e uma vez que a endometriose se desenvolve de tecido endometrial pela menstruação retrógrada, é razoável supor que o endométrio seja a fonte dessas neoplasias ovarianas. Finalmente, dados preliminares sugerem que os tumores mucinosos e de células transicionais (Brenner) resultem de um processo de metaplasia entre a disposição epitelial tipo-transicional para junção tubal-mesotelial (DERCHAIN; DUARTE-FRANCO; SARIAN, 2009; KURMAN; SHIH, 2010; PRAT, 2012).

Tabela 4 - Classificação das neoplasias ovarianas segundo a OMS – versão simplificada (2003)

Tumores do epitélio superficial/estroma (> 80%)	(continua)
<ul style="list-style-type: none"> • Serosos <ul style="list-style-type: none"> - Benigno - Maligno - Limítrofe • Mucinosos, tipo endocervical e tipo intestinal <ul style="list-style-type: none"> - Benigno - Maligno - Limítrofe • Endometrioides <ul style="list-style-type: none"> - Benigno - Maligno - Limítrofe • Células claras <ul style="list-style-type: none"> - Benigno - Maligno - Limítrofe • Células transicionais <ul style="list-style-type: none"> - Tumor de Brenner - Tumor de Brenner de baixo potencial de malignidade - Tumor de Brenner maligno 	

Tumores do epitélio superficial/estroma (> 80%)	
	(conclusão)
<ul style="list-style-type: none"> - Carcinoma de células de transição (tipo não Brenner) • Eiteliais-estromais <ul style="list-style-type: none"> - Adenossarcoma - Tumor mülleriano misto maligno 	
Tumores do estroma – cordão sexual (5-10%)	
<ul style="list-style-type: none"> • Tumores da granulosa • Fibromas • Fibrotecomas • Tecomas • Tumores de células de Sertoli • Tumores de célula de Leydig • Tumores do cordão sexual com túbulos anulares • Ginandroblastoma • Tumores de células esteroídicas (lipídicas) 	
Tumores de células germinativas (10-15%)	
<ul style="list-style-type: none"> • Teratoma <ul style="list-style-type: none"> - Imaturo - Maduro: sólido e cístico - Monodérmico • Disgerminoma • Tumor do saco vitelino • Tumores de células germinativas mistos 	
Malignos, sem outra especificação	
Câncer metastático de tumor primário não ovariano	
<ul style="list-style-type: none"> • Colônico, apendicular • Gástrico • Mamário 	

Fonte: Kumar e outros (2010) e Derchain e outros (2009).

3.2.4 Diagnóstico e prevenção

O diagnóstico do câncer de ovário é um problema comum na prática clínica. Não existem programas de rastreio para o diagnóstico precoce do carcinoma ovariano, e, geralmente, os tumores malignos do ovário são diagnosticados de forma ocasional ou quando o tumor já apresenta sintomas que indicam uma doença mais avançada, comumente já propagados para outros órgãos além do ovário (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011). Aproximadamente 70% das pacientes são diagnosticadas nos estádios III e IV, onde a sobrevida em cinco anos pode ser inferior a 20% (LIMA et al., 2009).

Os sintomas mais comuns do câncer ovariano são dor e distensão abdominais, sintomas dos aparelhos urinários e gastrointestinal decorrentes da compressão causada pelo tumor ou da invasão do câncer, e sangramentos abdominal e vaginal. As formas benignas podem ser completamente assintomáticas e, ocasionalmente, são encontradas de modo inesperado durante um exame abdominal ou pélvico ou uma cirurgia (KUMAR et al., 2010).

Em mulheres de alto risco para o câncer ovariano ou com sintomas suspeitos persistentes são usados como métodos de diagnóstico o exame físico, a ultrassonografia e a quantificação dos níveis séricos do marcador CA125 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012), um antígeno glicoproteico de alto peso molecular reconhecido por um anticorpo monoclonal OC125 (MEDEIROS et al., 2009).

O CA125, apesar de pouco específico e sensível em neoplasias iniciais, tem sido utilizado para detecção de tumores epiteliais e acompanhamento das pacientes com neoplasia diagnosticada (FILHO, 2011). Em geral, apresenta altos níveis em 80-85% das mulheres com câncer ovariano epitelial avançado e em 65% das pacientes com carcinoma de ovário mucinoso. Em pacientes no estadio I do câncer ovariano, apenas 50% apresentarão níveis elevados de CA125 (MEDEIROS et al., 2009).

Outros marcadores bioquímicos que podem ser usados no diagnóstico e seguimento de pacientes com câncer de ovário de origem não epitelial são a β -HCG e a α -fetoproteína, bons marcadores de tumores germinativos, além da α -inibina, utilizada como marcador de tumores dos cordões sexuais (FILHO, 2011).

3.2.5 Fatores prognósticos

O prognóstico do câncer de ovário é definido pela correlação com a sobrevida, refletindo o estadio, o tipo e grau histológico e a capacidade da paciente tolerar o tratamento para a doença. Além desses fatores pré-tratamento, outros que podem ter impacto na sobrevida incluem o tipo de tratamento recebido (citorredução ótima, quimioterapia baseada em derivados da platina) e o efeito da terapêutica sobre o tumor (ex. resposta completa) ou sobre a paciente (ex. mielossupressão) (REIS, 2005).

Entre os fatores prognósticos, o estadiamento da FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*), descrito na tabela 5, é considerado o fator mais importante. A sobrevida em cinco anos é de 95% para os casos de tumor localizado no ovário, 72% para os casos com implantação regional e 31% para os casos com tumor disseminado. No entanto, no momento do diagnóstico, 29% dos casos apresentam-se com tumor restrito aos ovários, 6% com tumores disseminados regionalmente e 59% com disseminação à distância (REIS, 2005).

Tabela 5 - Estadiamento dos tumores ovarianos definido pela FIGO.

Estadio I: Tumor limitado aos ovários (continua)
<ul style="list-style-type: none"> - Ia: Tumor limitado a um ovário; cápsula intacta, sem tumor na superfície ovariana; sem células malignas em líquido ascítico ou em lavados peritoneais - Ib: Tumor limitado a ambos os ovários; cápsulas intactas, sem tumor nas superfícies ovarianas; sem células malignas em líquido ascítico ou em lavados peritoneais - Ic: Tumor limitado a um ou ambos os ovários, com qualquer um dos seguintes achados: cápsula rompida, tumor na superfície ovariana, células malignas em líquido ascítico ou em lavados peritoneais
Estadio II: Tumor que envolve um ou ambos os ovários, com extensão pélvica
<ul style="list-style-type: none"> - IIa: Extensão e/ou implantes no útero e/ou trompa(s); sem células malignas em líquido ascítico ou em lavados peritoneais

Estadio II: Tumor que envolve um ou ambos os ovários, com extensão pélvica

(conclusão)

- IIb: Extensão para outros tecidos pélvicos; sem células malignas em líquido ascítico ou em lavados peritoneais
- IIc: Extensão pélvica (2a ou 2b), com células malignas em líquido ascítico ou em lavados peritoneais

Estadio III: Tumor que envolve um ou ambos os ovários, com metástase peritoneal fora da pélvis, confirmada microscopicamente, e/ou metástase em linfonodo regional

- IIIa: Metástase peritoneal microscópica, além da pélvis
- IIIb: Metástase peritoneal macroscópica, além da pélvis, com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
- IIIc: Metástase peritoneal, além da pélvis, com mais de 2 cm em sua maior dimensão, e/ou metástase em linfonodo regional

Estadio IV: Metástase à distância (exclui metástase peritoneal)

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (acesso em 20 set. 2012)

3.2.6 Tratamento

Diversas modalidades terapêuticas podem ser oferecidas para o tratamento do câncer ovariano, as quais incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, acesso em 20 set. 2012). O estadiamento definido pela FIGO é usado como referência para escolha do tratamento a ser empregado em pacientes com carcinoma de ovário (NATIONAL CANCER INSTITUTE, acesso em 20 set. 2012).

Em pacientes que apresentam recorrência da doença, as quais são frequentes em 80% dos casos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, acesso em 20 set. 2012), terapias adicionais podem ainda ser oferecidas com intuito paliativo, melhorando a qualidade de vida e sobrevida livre de progressão. Entre essas terapias, inclui-se a terapia de resgate que é baseada na sensibilidade a platina; pacientes são consideradas refratárias à platina quando apresentam progressão da

doença durante o tratamento ou que têm intervalo livre de doença menor do que seis meses após o tratamento primário com platina (ARAUJO et al., 2008).

3.3 GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA E DE OVÁRIO

A carcinogênese dos tumores de mama e de ovário é um processo complexo associado com diferentes tipos de alterações genéticas como mutações em oncogenes, genes supressores tumorais e genes de reparo do DNA (FENG et al., 2008; KALEMI et al., 2005; SCHWARZENBACH et al., 2007).

Mutações germinativas em genes de predisposição para o câncer de mama e de ovário parecem ser responsáveis pela maioria dos casos hereditários, no entanto, os mesmos representam apenas 5-10% dos casos de câncer de mama e até 15% dos casos de câncer de ovário (KIM et al., 2005; LYNCH et al., 2009; RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012)

Na maioria dos casos, os cânceres de mama e de ovário são esporádicos e parecem estar associados a polimorfismos em genes de suscetibilidade, os quais atuando junto com fatores endógenos ou fatores de risco associados ao estilo de vida podem ter uma significativa porcentagem no risco para o desenvolvimento dessas neoplasias (KIM et al., 2005; LURIE et al., 2009, MIYOSHI; NOGUCHI, 2003).

3.3.1 Mutações em genes de predisposição genética

Os genes de predisposição ao câncer de mama e de ovário hereditários melhores documentados são os BRCA1 e BRCA2, identificados, respectivamente, em 1994 e 1995 (MIKI et al., 1994; WOOSTER et al., 1995).

Ambos os genes pertencem à classe dos supressores tumorais e requerem a perda dos dois alelos funcionais antes do processo de tumorigênese (CARVALHO et al., 2010; NUSBAUM; VOGEL; READY, 2006-2007).

Os BRCA1 e 2 são considerados cuidadores do genoma, do inglês “*caretakers*”, (OLDENBURG et al., 2007) e células deficientes em BRCAs perdem a habilidade de reparar o *cross-link* e as quebras na dupla fita do DNA ocasionadas

por recombinação homóloga errônea, o que provavelmente acarreta a instabilidade genômica e a predisposição ao câncer (BIRGISDOTTIR et al., 2006).

BRCA1 é localizado no cromossomo 17q21 e é composto de 24 exons, dos quais 22 exons codificam uma proteína de 1.863 aminoácidos. O gene BRCA2 é localizado no cromossomo 13q12-q13, próximo ao gene do retinoblastoma (RB). É composto de 27 exons que são traduzidos em uma proteína de 3.418 aminoácidos (KIM et al., 2005).

Mutações em BRCA1 e 2 são presentes em menos de 1% da população geral, mas ocorrem mais frequentemente em certas etnias como os judeus *Ashkenazi* (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011). Nesse grupo de indivíduos, três mutações têm sido identificadas e são responsáveis por aproximadamente 98% das mutações detectadas: 185delAG e 5382insC no gene BRCA1 e 6174delT no gene BRCA2. Essas mutações são conhecidas como “mutações fundadoras” e são assim denominadas porque em certas populações iniciadas por um grupo ancestral pequeno, isolado pelo comportamento social ou geográfico, alguns genes, nos “fundadores originais”, podem tornar-se muito mais comuns em gerações sucessivas após o início do isolamento do que iria ocorrer na população em geral (SHULMAN, 2010).

Na síndrome do câncer de mama-ovário hereditária, estes dois genes são encontrados alterados em 80-90% dos casos (KRISTENSEN; BORRESEN-DALE, 2000). No câncer de mama familiar sem associação com carcinoma ovariano, BRCA1 e 2 são responsáveis por uma pequena porcentagem dessa neoplasia (SHULMAN, 2010), enquanto no câncer ovariano hereditário, mutações deletérias no gene BRCA1 são encontradas em 5-6% dos casos (LYNCH et al., 2009). Mutações em BRCA2 são, ainda, associadas fortemente com o câncer de mama masculino (SHULMAN, 2010).

Inicialmente os estudos sugeriram que mutações em BRCA1/2 conferiam um risco de até 57-87% e 27-44% durante o tempo de vida das mulheres para o câncer de mama e de ovário, respectivamente. Estudos mais recentes sugerem que portadoras de mutação em BRCA1 com idade de 70 anos tenham um risco de 54% para o câncer de mama e de 39% para o câncer de ovário, enquanto o risco seja de 45% para o câncer de mama e de 16% para o câncer ovariano em portadoras de mutação em BRCA2 (ENGEL et al., 2012). No entanto, os genes BRCA1 e 2 apresentam penetrância incompleta e mulheres portadoras de uma mutação idêntica

em uma mesma família podem não apresentar um mesmo fenótipo (KONTOROVICH et al., 2009).

Outros genes de predisposição ao câncer de mama e de ovário hereditários conferem um risco menor para o desenvolvimento dessas neoplasias que o ocasionado por mutações em BRCAs (SHULMAN, 2010).

Entre esses genes, encontra-se o supressor tumoral TP53, responsável pela codificação de uma fosfoproteína nuclear que atua como um fator de transcrição envolvido no controle da proliferação celular: modulação da progressão do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA, diferenciação celular e senescência (GALLO et al., 2005; NAGAI et al., 2003). Mutações germinativas neste gene ocasionam a síndrome de Li-fraumeni, responsável por 1% dos casos de câncer de mama hereditários e caracterizada por um início precoce dos casos de câncer de mama, de sarcomas de tecido mole, tumores adrenocorticais, cerebrais e leucemias (ALLAIN, 2008). Tumores adicionais relatados em famílias com essa síndrome incluem os tumores ovariano, pancreático, pulmonar, estomacal, melanoma e tumor de Wilms (SHULMAN, 2010). Mutações somáticas em TP53 também podem ser observadas em 12 a 60% dos casos de câncer de mama (NAGAI et al., 2003) e em 40 a 55% dos cânceres ovarianos (GALLO et al., 2005), sugerindo que alterações neste gene tenham um papel importante na progressão tumoral, independente da existência de uma predisposição hereditária.

Três outros genes que conferem predisposição ao câncer de mama hereditário são PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), LKB1/STK11 e CDH1/E-cadherin (OLDENBURG et al., 2007).

O gene supressor tumoral PTEN, localizado na posição 10q23.3, tem sido encontrado em 85% dos indivíduos com síndrome de Cowden, a qual é caracterizada pelo surgimento de diversas alterações na pele como triquilemonas e papilomas, apresentando ainda um risco aumentado para tumores benignos e malignos da mama, do endométrio e da tireoide (ALLAIN, 2008; NUSBAUM; VOGEL; READY, 2006-2007; OLDENBURG et al., 2007; SHULMAN, 2010). Mulheres portadoras de alteração no PTEN têm um aumento de 25-50% no risco para desenvolverem câncer de mama (OLDENBURG et al., 2007) e mutações neste gene também foram relatadas nos carcinomas endometrioides do ovário e uterino (LYNCH et al., 2009).

O gene LKB1/STK11 também atua como supressor tumoral e codifica uma serina/treonina quinase. Mutações germinativas neste gene causam a síndrome de Peutz-Jeghers, a qual está associada com um elevado risco para desenvolvimento de malignidades gastrointestinais e cânceres mamário, pancreático, ovariano, uterino, pulmonar e testicular. O risco de câncer de mama em portadoras de mutações neste gene com idade de 65 anos varia entre 29% e 54% (OLDENBURG et al., 2007).

O gene CDH1/E-cadherin codifica uma proteína que desempenha um papel importante na manutenção da diferenciação celular e na arquitetura normal dos tecidos epiteliais. Mulheres portadoras de mutação em CDH1/E-cadherin apresentam um risco para desenvolver câncer de mama entre 20 a 40%. Mutações somáticas neste gene são frequentemente observadas em câncer de mama lobular invasivo e *in-situ* (OLDENBURG et al., 2007; SHULMAN, 2010).

O câncer de ovário, por sua vez, pode ainda ser associado à síndrome de Lynch, também denominada de HNPCC (síndrome do câncer colorretal hereditário não polipoide), causada por mutações em genes do sistema de reparo (*MMR - Mismatch repair*) e associada com um risco aumentado para câncer em múltiplos órgãos incluindo endométrio, urogenital, trato biliar e pancreático e ovário (SHULMAN, 2010).

Em aproximadamente 70% dos casos da síndrome de Lynch familiar, uma mutação germinativa em um dos quatro genes de reparo do DNA - MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 - pode ser identificada (BUERKI et al., 2012). Pacientes com esta síndrome possuem um risco de 5 a 12% durante o seu tempo de vida para desenvolver o câncer de ovário e, aproximadamente, 10 a 15% dos cânceres ovarianos hereditários são parte da síndrome de Lynch (AYSAL et al., 2012).

Um elevado risco para o câncer de mama na síndrome de Lynch tem sido sugerido em alguns estudos, mas os resultados permanecem controversos (BUERKI et al., 2012).

3.3.2 Polimorfismos em genes de suscetibilidade

Os SNPs e os polimorfismos nas regiões do tipo STR, as quais são compostas de 1 a 6 nucleotídeos (PENA et al., 1993), têm sido estudados

extensivamente em genes de suscetibilidade no campo da oncologia para elucidar as interações genes-genes e gene-ambiente na carcinogênese e suscetibilidade individual ao câncer (TRAN et al., 2004; ZHANG; YU, 2007). Estes polimorfismos apresentam frequência superior a 1% e podem ou não causar alteração na função do produto proteico (ZHANG; YU, 2007).

Polimorfismos em genes de suscetibilidade podem estar envolvidos em uma grande variedade de funções que incluem os mecanismos de detoxificação de carcinógenos ambientais, metabolismo de hormônios esteroides, reparos de erros no DNA e supressores tumorais (DELORT et al., 2008; MIYOSHI; NOGUCHI, 2003; RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012).

Os genes relacionados ao metabolismo e produção de esteroides têm recebido uma especial importância e atenção no câncer de mama e de ovário, uma vez que essas doenças têm a sua carcinogênese influenciada por hormônios, entre eles, o estrogênio (DUMAS; DIORIO, 2011; GARNER et al., 2002; LURIE et al., 2009). Postula-se que a atividade dos produtos de tais genes possam afetar, em longo prazo, os níveis de estrogênio e seus metabólitos potencialmente carcinogênicos, influenciando o risco do câncer de mama e de ovário (GARNER et al., 2002).

O estrogênio tem sido identificado claramente como um carcinógeno por induzir aneuploidia e mudanças na estrutura cromossômica, enquanto seus metabólitos são responsáveis por produzir erros no DNA mediados por radicais livres, quebras na fita simples, formação de adutos no DNA, oxidação proteica e peroxidação lipídica, os quais disparam a instabilidade genética e erros no DNA (JAKUBOWSKA et al., 2010; RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012). Na mama, o estrogênio promove a estimulação das células mamárias, o que ocasiona uma proliferação mais acelerada, propiciando maiores chances para as células adquirirem mutações causadoras de câncer e aumentando a replicação dos clones de células portadores de tais erros genéticos (RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012).

3.3.2.1 Polimorfismos em enzimas envolvidas na síntese do estrogênio

A biossíntese do estrogênio (estradiol) a partir da cadeia do colesterol é realizada por meio da atividade de diferentes enzimas, demonstradas na figura 7. Os genes codificadores dessas enzimas têm sido clonados e polimorfismos genéticos têm sido identificados em muitos deles (KRISTENSEN; BORRESEN-DALE, 2000).

Três genes particularmente importantes na etapa da biossíntese do estradiol são os CYP11A, CYP17 e CYP19.

O gene CYP11A codifica a enzima P450_{scc} que catalisa a conversão do colesterol para pregnenolona. Esta é caracterizada como a primeira etapa para a biossíntese de todos os hormônios esteroides, incluindo estrogênio, progesterona e androgênio. O gene CYP11A é constituído de nove exons que apresentam 29.864 pares de bases localizadas no cromossomo 15q24.1 e é expresso nos tecidos do córtex adrenal, gônadas e placenta. (ZHANG; YU, 2007; ZHENG et al., 2004)

Uma repetição pentanucleotídica TAAAA foi identificada na região promotora do gene CYP11A, localizada a 529 pares de bases a montante do sítio de início da tradução e 487 pares de base a montante do exon 1 (ZHENG et al., 2004). Este polimorfismo tem sido associado com o risco de ovários policísticos e tem sido correlacionado com o nível total de testosterona circulante no soro (KRISTENSEN; BORRESEN-DALE, 2000; ZHENG et al., 2004). No estudo de Zheng e outros (2004), o alelo apresentando oito repetições pentanucleotídicas TAAAA foi observado em maior número no grupo de mulheres chinesas com câncer de mama em relação ao grupo controle, sugerindo que este polimorfismo também possa ser um fator de suscetibilidade importante para o câncer de mama.

O gene CYP17 codifica a enzima do citocromo P450_{c17 α} , a qual apresenta funções fundamentais na biossíntese do estrogênio (FEIGELSON; HENDERSON, 2000). Essa enzima cataliza a 17 α -hidroxilação da pregnenolona e progesterona, além de catalisar a conversão do C21 esteroide em C17; atividades requeridas para a síntese de androgênio e estrogênio (KRISTENSEN et al., 1999; KRISTENSEN; BORRESEN-DALE, 2000).

O gene CYP17 está localizado no cromossomo 10, locus q24.3, e contém oito exons e sete introns (DUMAS; DIORIO, 2011; KRISTENSEN et al., 1999). A região 5' não traduzida apresenta um SNP localizado a 34 pares de base a montante do início do sítio de tradução (ZHANG et al., 2009). Este polimorfismo é caracterizado pela mudança do alelo T (A1) para C (A2), a qual cria um sítio promotor adicional, aumentando a transcrição do gene CYP17 e,

consequentemente, aumentando a atividade enzimática. Níveis altos de estrogênio têm sido identificados em mulheres pré e pós-menopáusicas portadoras do alelo C, gerando a hipótese de que portadoras deste alelo podem ter um risco aumentado para o câncer de mama (DUMAS; DIORIO, 2011). No câncer de ovário, a presença do alelo C tem sido associada com o aumento do risco para essa doença, além do variante A2 ser associado com a síndrome do ovário policístico, uma condição resultante de altos níveis do hormônio androgênio e um importante fator de risco para o carcinoma ovariano (GOODMAN et al., 2001).

O gene CYP19 é localizado no cromossomo 15q21.1 (MA et al., 2010), codifica a enzima CYP19 ou aromatase, a qual catalisa a conversão do androgênio para estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

Alta expressão da aromatase tem sido observada no tecido tumoral da mama em relação ao tecido normal e a atividade desta enzima tem estimulado o crescimento das células tumorais mamárias, sendo a principal fonte de E2 no câncer de mama e nos tecidos adjacentes em mulheres pós-menopáusicas (DUMAS; DIORIO, 2011).

Variações polimórficas no gene CYP19 podem alterar a atividade da aromatase e consecutivamente afetar os níveis hormonais. Um dos principais polimorfismos é a repetição tetranucleotídica TTTA no intron 4 deste gene, a qual pode ter um efeito na tradução da enzima, uma vez que essa repetição situa-se em um sítio de *splice* (RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012).

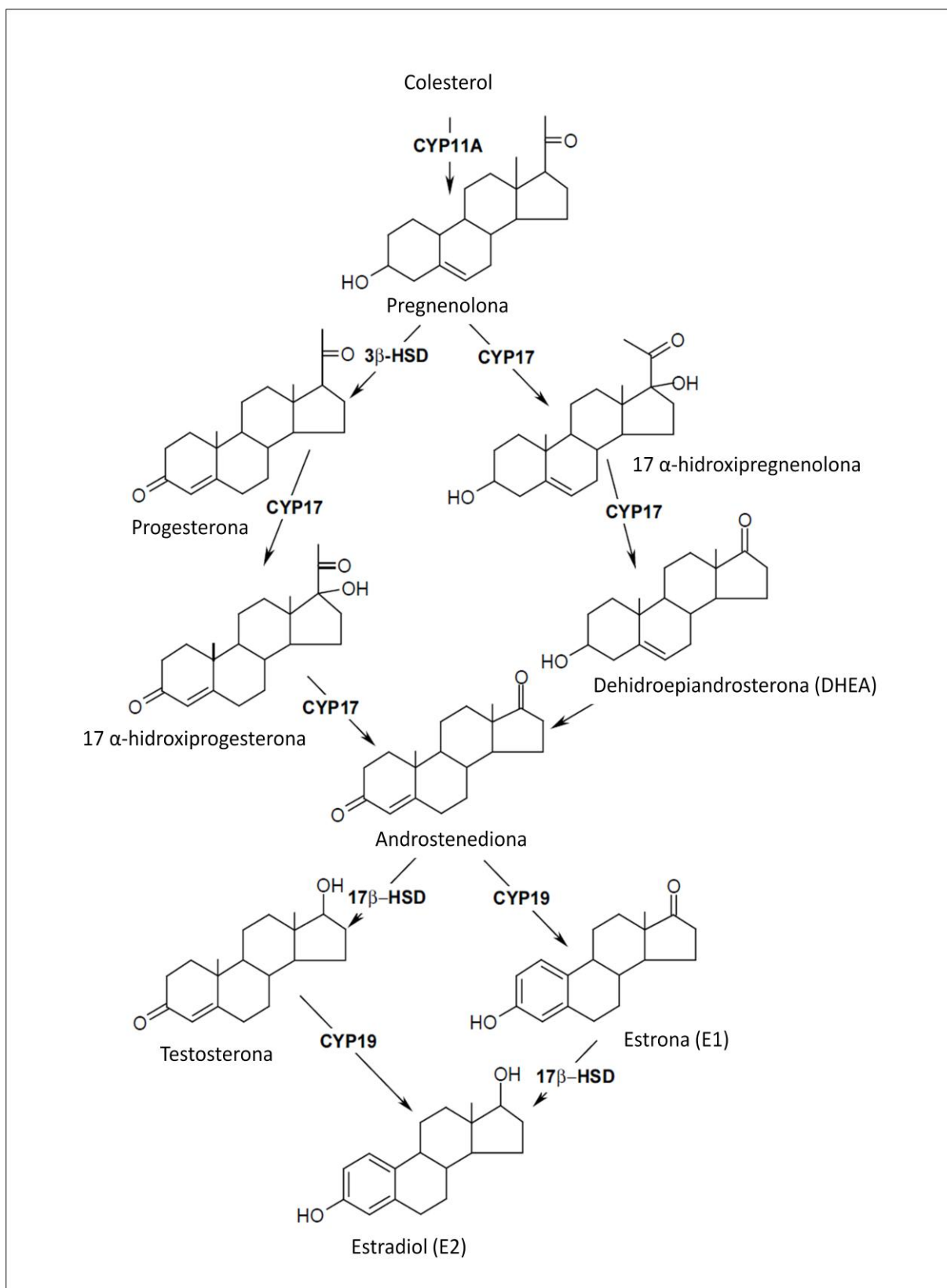


Figura 7 - Biossíntese do estradiol a partir da cadeia do colesterol
 Fonte: Mitrunen e Hirvonen (2003).

3.3.2.2 Polimorfismos em enzimas envolvidas no metabolismo do estrogênio

A metabolização da cadeia do estrogênio envolve várias enzimas (Figura 8) de fase I, compostas principalmente por enzimas do citocromo P450, as denominadas CYPs, e várias enzimas de fase II, as quais são compostas, entre outras enzimas, por glutathione-S-transferase (GSTs), sulfotransferases (SULTs) e UDP glucuronosiltransferases (UGTs) (MARIE-GENICA CONSORTIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY FOR MENOPAUSAL HORMONE THERAPY RELATED BREAST CANCER RISK, 2010; TORRESAN et al., 2008).

A metabolização do estradiol produz compostos reativos pelas enzimas de fase I, os quais parecem causar danos ao DNA e induzir a carcinogênese (SHATALOVA et al., 2005). As enzimas da fase II, por sua vez, conjugam os compostos endógenos e exógenos e os metabólitos da fase I produzindo, geralmente, compostos solúveis a base de água e inativados, os quais podem ser excretados por meio da urina ou bile (MARIE-GENICA CONSORTIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY FOR MENOPAUSAL HORMONE THERAPY RELATED BREAST CANCER RISK, 2010).

Entre as enzimas de fase II, as GSTs catalisam a conjugação da glutathione e produzem metabólitos com alta hidrofiliabilidade, os quais são facilmente excretados (RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012; SERGENTANIS; ECONOMOPOULOS, 2010), enquanto a UGT1A1 realiza a glucoronidação dos metabólitos reativos, convertendo-os em produtos inativos biologicamente solúveis em água (DUMAS; DIORIO, 2011; SHATALOVA et al., 2005).

A grande família das GSTs é um grupo complexo, subdividido em sete distintas classes que são designadas como α (alpha), μ (mu), π (pi), σ (sigma), θ (theta), ω (omega) e ζ (zeta). Esta classificação é baseada nas similaridades das sequências de aminoácidos, estrutura gênica e reatividade imunológica. (RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012).

A classe π (pi) das GSTs é codificada por um gene localizado no cromossomo 11q13.2, o GSTP1, e é a principal classe de GST expressa constitutivamente em ambos os tecidos normal e tumoral da mama (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

Dois polimorfismos foram descritos para este gene: um no códon 105 que resulta na mudança do aminoácido Ile→Val (A313G) e outro no códon 114 que acarreta a troca do aminoácido Ala→Val (C314T) (TORRESAN et al., 2008).

O polimorfismo Ile→Val é localizado próximo ao sítio de ligação do substrato e pode resultar em redução na atividade da enzima (TORRESAN et al., 2008); o variante Val tem demonstrado ter menor ou maior atividade/afinidade específica que o variante Ile, dependendo do substrato (RAMALHINHO; FONSECA-MOUTINHO; GRANADEIRO, 2012).

No estudo de Sergeantanis e Economopoulos (2010), o genótipo Val/Val no gene GSTP1 foi associado com aumento no risco do câncer de mama na população chinesa, enquanto em populações não chinesas essa mesma associação não foi observada. Geralmente, estudos epidemiológicos sobre a potencial associação deste polimorfismo e o câncer de mama têm produzido resultados inconsistentes, enquanto para o câncer de ovário, poucos estudos foram realizados para verificar a associação deste polimorfismo com as neoplasias ovarianas (ANTOGNELLI et al., 2009; TORRESAN et al., 2008).

A enzima UGT1A1 é codificada por um gene localizado sob o cromossomo 2q37 (DUMAS; DIORIO, 2011). Mais de 60 alelos variantes foram descritos e o polimorfismo mais comumente analisado é o relacionado à repetição dinucleotídica TA na região promotora TATA box do gene (DUMAS; DIORIO, 2011; SHATALOVA et al., 2005). Este polimorfismo apresenta uma inversa relação entre o número de repetições TA e o nível de atividade transcricional da enzima, influenciando os níveis de expressão enzimáticos e, consequentemente, a atividade enzimática. Os alelos com cinco e seis repetições (UGT1A1*33 e UGT1A1*1, respectivamente) são associados com uma alta atividade da enzima, enquanto os alelos com sete e oito repetições (UGT1A1*28 e UGT1A1*34, respectivamente) são associados com uma menor atividade enzimática (SHATALOVA et al., 2005).

Em um estudo realizado com mulheres chinesas, o alelo UGT1A1*28 foi associado com um aumento no risco para o câncer de mama em mulheres com idade inferior a 40 anos (ADEGOKE et al., 2004), enquanto no estudo de Shatalova e outros (2005), os genótipos UGT1A1*28/*28 e UGT1A1*28/*34 foram associados com um início tardio do câncer de mama.

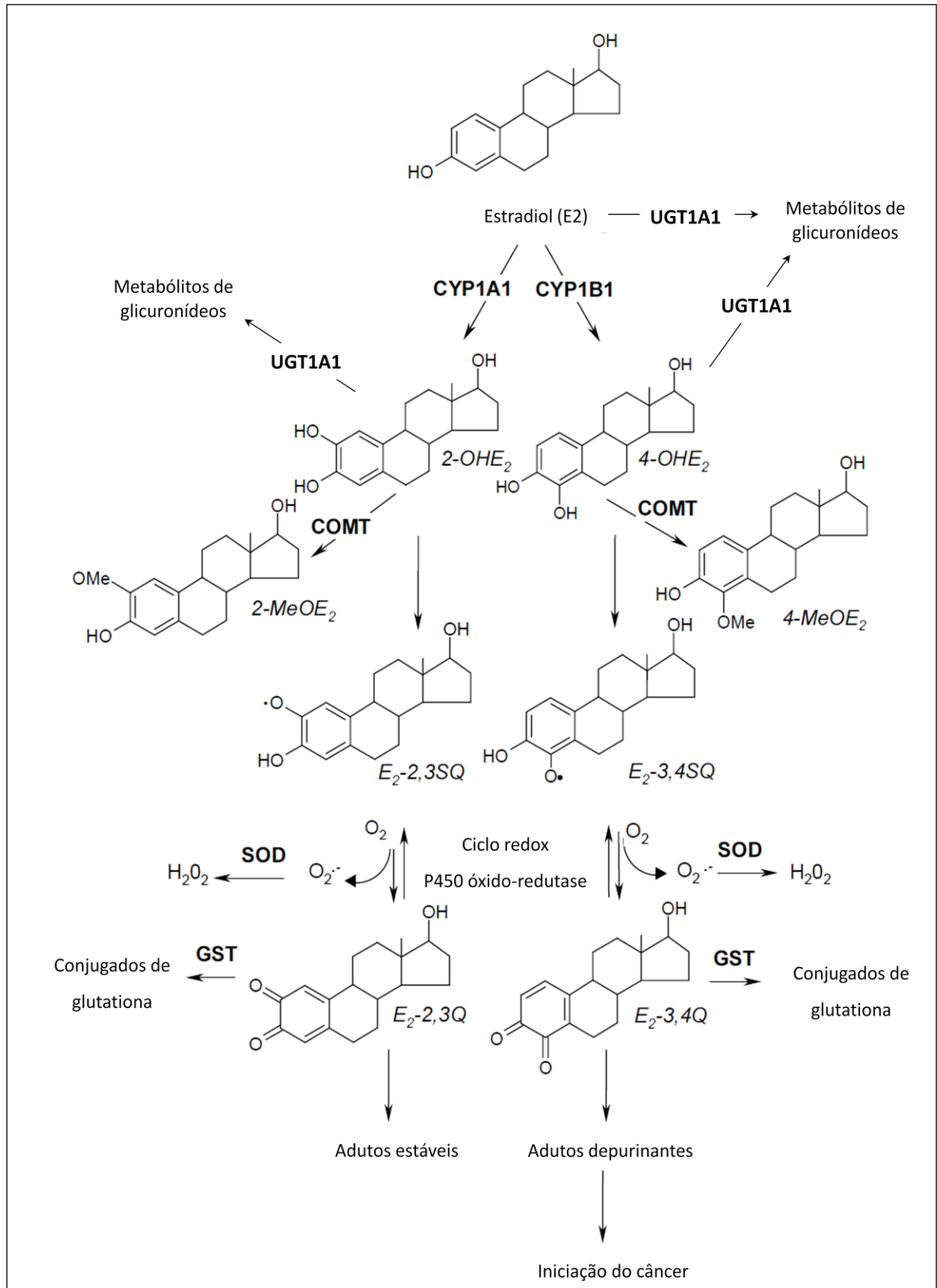


Figura 8 - Metabolismo do estradiol

Fonte: Mitrunen e Hirvonen (2003).

3.3.2.3 Polimorfismos em marcadores do tipo STR

Polimorfismos nas regiões do tipo STR, também denominadas de microssatélites, ocorrem devido a expansões ou contrações dessas sequências por meio do aumento ou diminuição das unidades repetitivas durante a replicação do DNA (ZHANG; YU, 2007). Na replicação, as fitas do DNA podem apresentar um pareamento deslocado por meio de alças que se formam nas regiões repetitivas, mecanismo conhecido como *slipped* (Figura 9), aumentando ou diminuindo as unidades de repetição (PELTOMÄKI, 2003) e originando a MSI.

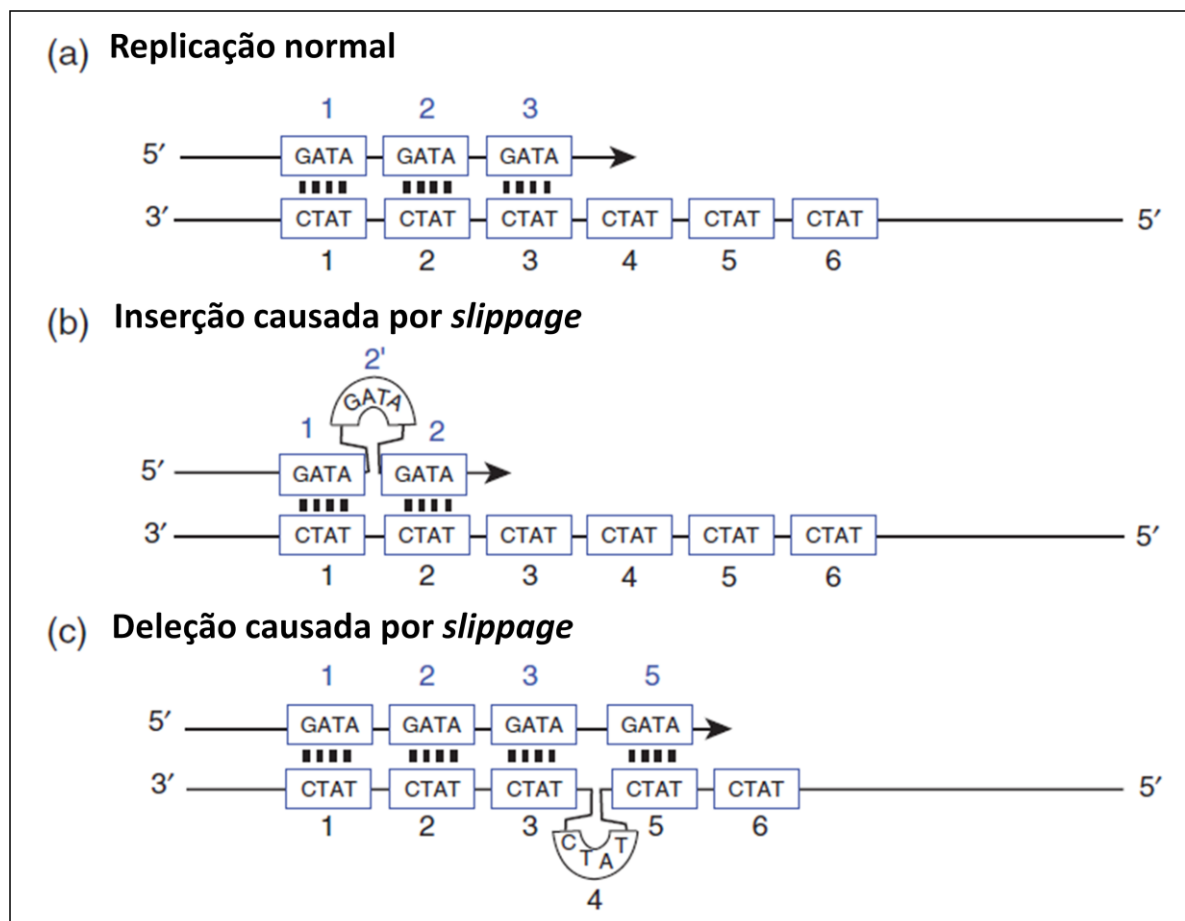


Figura 9 - Ilustração do mecanismo de *slipped* que pode ocorrer durante a replicação do DNA

Fonte: figura adaptada segundo Butler (2005).

A MSI foi descrita em 1993 na síndrome de Lynch (HNPCC) (BOLAND et al., 1998), na qual é observada em 90% dos casos. Desde então, tem sido estudada

em outros tumores, sendo observada em uma variedade de cânceres esporádicos, incluindo endométrio, pâncreas e bexiga (YOON et al., 2008), e com uma frequência variável entre os carcinomas.

No câncer de mama, não há um consenso a respeito da frequência de MSI. Alguns estudos relatam que a MSI não é associada com este tipo de neoplasia, enquanto outros pesquisadores descrevem frequências que variam entre 5 a 40% (SHEN et al., 2000). No câncer ovariano, a frequência de MSI varia entre 5 a 50% (SOOD et al., 2001), sendo as maiores frequências observadas nos tumores endometrioides, mucinosos e de células claras (PLISIECKA-HAŁASA et al., 2008).

A variação na frequência de MSI é postulada ser decorrente de diferenças no estadiamento dos tumores, na definição de MSI adotada e no número e tipo de marcadores utilizados para análise; algumas regiões do tipo STR têm demonstrado serem mais propensas ao fenômeno da instabilidade (MURATA et al., 2002; PAL et al., 2008; SOOD et al., 2001).

Em 1997, o *National Cancer Institute* (NCI), com o intuito de normalizar as análises com marcadores do tipo STR, elaborou um painel sugestivo de STRs a serem analisados nos tumores colorretais. Este painel, conhecido como painel de *Bethesda*, inclui dois marcadores mononucleotídicos (BAT25 e BAT26) e três marcadores dinucleotídicos (D5S346, D2S123 e D17S250); em adição, loci alternativos também são sugeridos para análises (KULIGINA et al., 2007; LOUKOLA et al., 2001). Utilizando os marcadores deste painel, os tumores colorretais podem ser classificados como tumores com alto grau de MSI (MSI-H - *MSI-high*), quando apresentam alteração em dois ou mais marcadores dos cinco STR analisados, e como tumores com baixo grau de instabilidade (MSI-L - *MSI-low*), quando apresentam alteração em apenas um dos cinco marcadores investigados. Tumores nos quais nenhum dos marcadores exibe MSI são definidos como microssatélites estáveis (MSS) (KULIGINA et al., 2007; LOUKOLA et al., 2001).

Na síndrome de Lynch, a MSI é decorrente de mutações germinativas em genes do sistema de reparo MMR, o qual é responsável por eliminar os *mismatches* de base única e os laços (alças) formados durante a replicação do DNA (CHIALINA et al., 2006; PELTOMÄKI, 2003).

Em alguns tumores esporádicos, principalmente aqueles que fazem parte do espectro da síndrome de Lynch, o sistema MMR parece estar inativado devido à hipermetilação das regiões promotoras dos genes codificadores deste sistema

(KULIGINA et al., 2007). Na maioria dos cânceres esporádicos, no entanto, o mecanismo responsável pelo surgimento da MSI ainda não foi completamente elucidado e pode, possivelmente, envolver genes e mecanismos diferentes dos responsáveis por ocasionar MSI nos casos relacionados à síndrome de Lynch (CALDÉS et al., 2000).

No câncer de ovário, a síndrome de Lynch é a terceira principal causa de câncer de ovário hereditário e o sistema MMR pode estar comprometido em uma proporção razoável de casos de câncer ovariano como consequência de alterações genéticas ou epigenéticas (PAL; PERMUTH-WEY; SELLERS, 2008). No entanto, a regra dos genes deste sistema de reparo nas malignidades ovarianas é ainda grandemente desconhecida (GEISLER et al., 2003).

No câncer de mama, a MSI parece ser decorrente de alterações em genes diferentes e por mecanismos distintos dos que ocorrem na síndrome de Lynch, uma vez que: i) MSI ocorre em um menor número de marcadores; ii) os marcadores que apresentam MSI são tri ou tetranucleotídicos (VAURS-BARRIÈRE et al., 2000), enquanto nos cânceres colorretais, o marcador mononucleotídico BAT26 é sozinho suficiente para a determinação de MSI (PELTOMÄKI, 2003); iii) a MSI é caracterizada pelo surgimento de um novo alelo de diferente tamanho do alelo normal (VAURS-BARRIÈRE et al., 2000).

A análise dos marcadores do tipo STR, altamente polimórficos, não somente providencia informações sobre MSI, como também permite a detecção de LOH nas células tumorais (POWIERSKA-CZARNY et al., 2003).

LOH representa a perda de um alelo de função normal em um gene no qual o outro alelo já se encontrava alterado (ANDO et al., 2000) e é uma das alterações mais frequentes em tumores sólidos (SIGBJÖRNSDOTTIR et al., 2000).

A ocorrência de LOH parece ser resultante de falhas nas funções de manutenção da integridade do genoma, as quais incluem os processos de replicação fiel e reparação de danos do DNA, proteção do telômero, segregação cromossômica na mitose ou recombinação não programada (THIAGALINGAM et al., 2002).

Áreas com alta frequência de LOH parecem indicar regiões apresentando supressores tumorais (SIGBJÖRNSDOTTIR et al., 2000), onde a perda randômica do alelo funcional pode conferir vantagem no crescimento celular, ocasionando a expansão clonal das células com a alteração (ANDO et al., 2000). Ademais, LOH

parece refletir instabilidade cromossômica aleatória, indicando erros e instabilidade no DNA (TOKUNAGA et al., 2012).

A presença de LOH em determinadas regiões cromossômicas tem sido, ainda, consistentemente observada para específicos tipos de câncer (THIAGALINGAM et al., 2002) e tem apresentado influência sobre a resposta tumoral ao tratamento quimioterápico (PLISIECKA-HAŁASA et al., 2008).

No câncer de mama, LOH foi associada com o aspecto agressivo de tumores HER2 positivos de alto grau e tumores triplo negativos (TOKUNAGA et al., 2012), e tem sido frequentemente detectada sob os cromossomos 1q, 3p, 6q, 11p, 13q, 16q, 17p, 17q e 18q, sob os quais muitos supressores tumorais, como TP53, BRCA1, BRCA2 e RB, foram mapeados (ANDO et al., 2000).

No carcinoma ovariano, LOH é um fenômeno frequentemente observado sob os cromossomos 3p, 5q, 6, 9p, 11, 13, 16q, 17, 18 e 22. No entanto, ainda não se tem o conhecimento de todos os genes existentes nos loci apresentando altas frequências de LOH, assim como não se conhece quão importante tais genes poderiam ser para a carcinogênese no ovário (PLISIECKA-HAŁASA et al., 2008).

3.3.2.3.1 Polimorfismos nos $ER\alpha$, $ER\beta$ e AR

Polimorfismos em genes codificadores dos receptores de hormônios esteroides, como o receptor de estrogênio alfa ($ER\alpha$), receptor de estrogênio beta ($ER\beta$) e o receptor de androgênio (AR), parecem ser fortes candidatos de suscetibilidade para o câncer de mama e de ovário (DRUMMOND; FULLER, 2012; LEVINE; BOYD, 2001; NUSBAUM; VOGEL; READY, 2006-2007).

O $ER\alpha$ e o $ER\beta$ pertencem à família de receptores nucleares e atuam como fatores de transcrição ligantes dependentes (LURIE et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

Ambos os receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$ são expressos nas células normais e tumorais do tecido mamário (DUMAS; DIORIO, 2011) e na superfície epitelial ovariana, sendo o $ER\beta$, o tipo predominante nos ovários normais (LURIE et al., 2009).

A expressão de $ER\alpha$ é utilizada na prática clínica como indicador para seleção da terapia hormonal em pacientes com câncer de mama e a perda da sua

expressão é muitas vezes associada com um pior prognóstico (BOYAPATI et al., 2005). O receptor ER β , por sua vez, parece estar relacionado a atividades antiproliferativas, apresentando funções antagonistas às funções do ER α (DUMAS; DIORIO, 2011; DRUMMOND; FULLER, 2012). A perda da expressão do ER β tem sido observada nos cânceres de mama, colo e próstata. No câncer de ovário, a perda de expressão do ER β parece constituir um processo essencial na carcinogênese desta neoplasia. Apesar do preciso mecanismo da atuação do ER β no câncer de ovário ainda permanecer incerto, estudos têm relatado o envolvimento deste receptor no controle da proliferação celular, motilidade e apoptose no carcinoma ovariano (LURIE et al., 2009).

O gene que codifica o ER α está localizado sob o cromossomo 6q25.27 e sua região promotora contém uma repetição dinucleotídica TA polimórfica, enquanto o gene que codifica o ER β está localizado na posição 14q23-24 e contém na sua região 3' não traduzida, uma repetição dinucleotídica CA. A funcional regra destes polimorfismos ainda não foi determinada, no entanto, acredita-se que os mesmos possam influenciar a expressão destes genes (ANGHEL et al., 2006).

O AR é uma proteína intracelular também pertencente à família dos receptores nucleares, atuando, semelhantemente aos ER α e β , como um fator transcricional ligante-dependente (NICOLÁS DÍAZ-CHICO et al., 2007).

O gene que codifica o AR é localizado na posição Xq11-12. No domínio amino-terminal do gene encontra-se uma repetição trinucleotídica CAG polimórfica que parece influenciar a função do receptor como fator de transcrição. A região CAG no gene parece estar envolvida na interação entre o receptor e os diferentes co-ativadores, inibindo essa interação nos portadores de alelos com maiores repetições, e ocasionando uma menor atividade do AR (WESTBERG et al., 2001).

No câncer de mama, o AR é expresso na maioria dos casos desta neoplasia e sua presença nas células cancerosas parece estar associada com tecido tumoral menos diferenciado (ANGHEL et al., 2006). No estudo de Abreu e outros (2007), LOH no gene AR foi observada em 1/12 casos de hiperplasia da mama e em 4/20 casos de carcinoma da mama.

No câncer de ovário, o AR é expresso em mais de 80% das células de carcinomas ovarianos epiteliais (ELATTAR et al., 2012), sendo postulada uma associação positiva entre o androgênio e o risco do câncer ovariano (GOODMAN et al., 2001). A estimulação do AR parece ocasionar um aumento na proliferação

celular e diminuição da apoptose nas células da superfície ovariana e nas células do câncer de ovário, no entanto os mecanismos pelos quais os andrógenos exercem seus efeitos sobre as células de câncer de ovário são ainda apenas parcialmente compreendidos (ELATTAR et al., 2012).

4 REFERÊNCIAS

- ABRÃO, F.S. **Tratado de oncologia genital e mamária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.
- ABREU, E.; KOIFAN, S. Fatores prognósticos no câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113-131, 2002.
- ABREU, F.B. et al. Shorter CAG repeat in the AR gene is associated with atypical hyperplasia and breast carcinoma. **Anticancer Research**, v. 27, n. 2, p. 1199-1205, 2007.
- ADEGOKE, O.J. et al. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and risk of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 85, n. 3, p. 239-245, 2004.
- ALLAIN, D.C. Genetic counseling and testing for common hereditary breast cancer syndromes: a paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 5, p. 383-395, 2008.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012**. Atlanta: American Cancer Society, 2011.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2012**. Atlanta: American Cancer Society, 2012.
- AMORIM, L.F. et al. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. **Cancer Letters**, v. 181, n. 2, p. 179-186, 2002.
- ANDO, Y. et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. **Cancer Letters**, v. 156, p. 207-214, 2000.
- ANGHEL, A. et al. Combined profile of the tandem repeats CAG, TA and CA of the androgen and estrogen receptor genes in breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 132, n. 11, p. 727-733, 2006.
- ANTOGNELLI, C. et al. CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study. **BMC Cancer**, v. 9, 2009. 14 p.
- ARAÚJO, L.H.L. et al. Uso de topotecan no tratamento do tumor epitelial de ovário refratário à platina: experiência do INCA. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 54, n. 2, p. 131-138, 2008.
- ASHTON-PROLLA, P. et al. Development and validation of a simple questionnaire for the identification of hereditary breast cancer in primary care. **BMC Cancer**, v. 9, p. 283-291, 2009.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA; CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. **Projeto Diretrizes:** Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama, 2001. 15 p.

AYSAL, A. et al. Ovarian endometrioid adenocarcinoma: incidence and clinical significance of the morphologic and immunohistochemical markers of mismatch repair protein defects and tumor microsatellite instability. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 163-172, 2012.

BIRGISDOTTIR, V. et al. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 4, 2006. 10 p.

BOLAND, C.R. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 58, p. 5248-5257, 1998.

BOYAPATI, S.M. et al. Polymorphisms in ER-alpha gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 1093-1098, 2005.

BUERKI, N. et al. Evidence for breast cancer as an integral part of Lynch syndrome. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 51, n. 1, p. 83-91, 2012.

BITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M.C.F. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 22, p. S69-S82, 2011.

BUTLER, J.M. **Forensic DNA typing:** biology, technology, and genetics of STR markers. 2. ed. USA: Elsevier Academic Press, 2005.

CALDÉS, T. et al. Microsatellite instability correlates with negative expression of estrogen and progesterone receptors in sporadic breast cancer. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 20, n. 5, p. 283-291, 2000.

CARVALHO, L.V. et al. Molecular characterization of breast cancer in young Brazilian women. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 278-287, 2010.

CHEANG, M.C. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p.736-750, 2009.

CHIALINA, S.G. et al. Microsatellite instability analysis in hereditary non-polyposis colon cancer using the Bethesda consensus panel of microsatellite markers in the absence of proband normal tissue. **BMC Medical Genetics**, v. 7, 2006. 5 p.

CIRQUEIRA, M.B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **FEMINA**, v. 39, p. 499-503, 2011.

CUI, X. et al. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p.7721-7735, 2005.

DANSONKA-MIESZKOWSKA, A. et al. Geographical variations in TP53 mutational spectrum in ovarian carcinomas. **Annals of Human Genetics**, v. 70, p. 594-604, 2006.

DELORT, L. et al. Association between genetic polymorphisms and ovarian cancer risk. **Anticancer Research**, v. 28, p. 3079-3081, 2008.

DERCHAIN, S.F.M.; DUARTE-FRANCO, E.; SARIAN, L.O. Panorama atual e perspectivas em relação ao diagnóstico precoce do câncer de ovário. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 4, p.159-163, 2009.

DIKSHIT, R.P. et al. Increase in breast cancer incidence among older women in Mumbai: 30-year trends and predictions to 2025. **Cancer Epidemiology**, v. 36, n. 4, p. e215-220, 2012.

DRUMMOND, A.E.; FULLER, P.J. Ovarian actions of estrogen receptor- β : an update. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 30, n. 1, p. 32-38, 2012.

DUMAS, I.; DIORIO, C. EStrogen pathway polymorphisms and mammographic density. **Anticancer research**, v. 31, p. 4369-4386, 2011.

ELATTAR, A. et al. Androgen receptor expression is a biological marker for androgen sensitivity in high grade serous epithelial ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 124, n. 1, p.142-147, 2012.

ENGEL, N.J. et al. A multidisciplinary clinic for individualizing management of patients at increased risk for breast and gynecologic cancer. **Familial Cancer**, 2012. DOI 10.1007/s10689-012-9530-x.

ERIKSSON, L. et al. Mammographic density and molecular subtypes of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 1, p. 18-23, 2012.

FEIGELSON, H.S.; HENDERSON, B.E. Future possibilities in the prevention of breast cancer: role of genetic variation in breast cancer prevention. **Breast Cancer Research**, v. 2, n. 4, p. 277-282, 2000.

FENG, Q. et al. DNA hypermethylation, Her-2/neu overexpression and p53 mutations in ovarian carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 111, n. 2, p. 320-329, 2008.

FILHO, G.B. **Bogliolo, patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FRASSON, A. et al. **Doenças da Mama: Guia prático baseado em evidências**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

GALLO, C.V.M. et al. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: Current knowledge and perspectives. **Mutation Research**, v. 589, p. 192-207, 2005.

GARNER, E.I. et al. Polymorphisms of the estrogen-metabolizing genes CYP17 and catechol-O-methyltransferase and risk of epithelial ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 62, n. 11, p. 3058-3062, 2002.

GEISLER, J.P. et al. Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma. **Cancer**, v. 98, n. 10, p. 2199-2206, 2003.

GOODMAN, M.T. et al. CYP17 genotype and ovarian cancer: a null case-control study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, n. 5, p. 563-564, 2001.

HEDELIN, M. et al. Dietary phytoestrogens and the risk of ovarian cancer in the women's lifestyle and health cohort study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. 2, p. 308-317, 2011.

HICKEY, K.P. et al. Molecular detection of tumour DNA in serum and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 11, p. 1803-1808, 1999.

HIGGINS, M.J.; STEARNS, V. Understanding resistance to tamoxifen in hormone receptor-positive breast cancer. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 1453-1455, 2009.

HILDEBRAND, J.S. et al. Postmenopausal hormone use and incident ovarian cancer: Associations differ by regimen. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2928-2935, 2010.

HOLSCHNEIDER, C.H; BEREK, J.S. Ovarian Cancer: Epidemiology, Biology, and Prognostic Factors. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 19, p. 3-10, 2000.

HUAN, Z. et al. Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival. **Oncology Reports**, v. 19, n. 3, p. 775-781, 2008.

IMYANITOV, E.M.; HANSON, K.P. Mechanisms of breast cancer. **Drug Discovery Today: Diseases Mechanisms**, v. 1, p. 235-245, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de ovário**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>>. Acesso em: 20 set. 2012.

JAKUBOWSKA, A. et al. BRCA1-associated breast and ovarian cancer risks in Poland: no association with commonly studied polymorphisms. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 119, n. 1, p. 201-211, 2010.

JIAO, H. et al. Association of CYP1B1 Polymorphisms with Breast Cancer: A Case-Control Study in the Han Population in Ningxia Hui Autonomous Region, P. R. China. **Biomarker Insights**, v. 5, p. 21-27, 2010.

KALEMI, T.G. et al. The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. **Cancer Letters**, v. 222, n. 1, p.57-65, 2005.

KIM, Y.T. et al. Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 in Korean sporadic ovarian carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 99, n.3, p. 585-590, 2005.

KIM, J.Y. et al. The association between genetic polymorphisms in CYP19 and breast cancer risk in Korean women. **Oncology Reports**, v. 22, n.3, n. 487-492, 2009.

KONTOROVICH, T. et al. Promoter methylation patterns of ATM, ATR, BRCA1, BRCA2 and p53 as putative cancer risk modifiers in Jewish BRCA1/BRCA2 mutation carriers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 116, n. 1, p. 195-200, 2009.

KOTSOPOULOS, J. et al. Height, weight, BMI and ovarian cancer survival. **Gynecologic Oncology**, v. 127, n. 1, p. 83-87, 2012.

KRISTENSEN, V.N. et al. CYP17 and breast cancer risk: the polymorphism in the 5' flanking area of the gene does not influence binding to Sp-1. **Cancer Research**, v. 59, n. 12, p. 2825-2828, 1999.

KRISTENSEN, V.N.; BORRESEN-DALE, A.L. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. **Mutation Research**, v. 462, p. 323-333, 2000.

KULIGINA, E.SH. et al. Microsatellite instability analysis of bilateral breast tumors suggests treatment-related origin of some contralateral malignancies. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 133, n. 1, p. 57-64, 2007.

KUMAR, V. et al. **Robbins & Cotran, bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KURMAN, R.J.; SHIH, IE.M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 3, p. 433-443, 2010.

LEVINE, D.A.; BOYD, J. The Androgen Receptor and Genetic Susceptibility to Ovarian Cancer: Results from a Case Series. **Cancer Research**, v. 61, p. 908-911, 2001.

LI, C.I.; URIBE, D.J.; DALING, J.R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 93, p. 1046-1052, 2005.

LIMA, R.A. et al. Ooforectomia profilática: indicações atuais. **FEMINA**, v. 37, p. 155-158, 2009.

LIMA, M.A.; SILVA, B.B. Expression of Ki-67 and Bcl-2 biomarkers in normal breast tissue from women of reproductive age treated with raloxifene. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 285, n. 1, p. 223-227, 2012.

LIU, Q. et al. Expression of CD133, PAX2, ESA, and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas. **Chinese Medical Journal (English Edition)**, v. 122, n. 22, p. 2763-2769, 2009.

LOUKOLA, A. et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). **Cancer Research**, v. 61, n. 11, p. 4545-4549, 2001.

LURIE, G. et al. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene and the risk of epithelial ovarian carcinoma. **Cancer Causes and Control**, v. 20, n. 1, p. 47-55, 2009.

LYNCH, H.T. et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. **Molecular Oncology**, v. 3, n. 2, p. 97-137, 2009.

MA, X. et al. Association between CYP19 polymorphisms and breast cancer risk: results from 10,592 cases and 11,720 controls. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, n. 2, p. 495-501, 2010.

MALHOTRA, G.K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, n. 10, p. 955-960, 2010.

MARIE-GENICA CONSORTIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY FOR MENOPAUSAL HORMONE THERAPY RELATED BREAST CANCER RISK. Genetic polymorphisms in phase I and phase II enzymes and breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy in postmenopausal women. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 119, n. 2, p. 463-474, 2010.

MEDEIROS, L.R. et al. Accuracy of CA 125 in the diagnosis of ovarian tumors: a quantitative systematic review. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 142, n. 2, p. 99-105, 2009.

MIKI, Y. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 66-71, 1994.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutation Research**, v. 544, n. 1, p. 9-41, 2003.

MIYOSHI, Y.; NOGUCHI, S. Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing genes and breast cancer risk in Japanese women. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 10, p. 471-481, 2003.

MORABITO, A. et al. Prognostic and predictive indicators in operable breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 3, n. 6, p. 381-390, 2003.

MURATA, H. et al. Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. **Oncogene**, v. 21, p. 5696-5703, 2002.

MURPHY, M.A.; WENTZENSEN, N. Frequency of mismatch repair deficiency in ovarian cancer: a systematic review. **International Journal of Cancer**, v. 129, p. 1914-1922, 2011.

NAGAI, M.A. et al. TP53 mutations in primary breast carcinomas from white and African-Brazilian patients. **International Journal of Oncology**, v. 23, p. 189-196, 2003.

NAGLE, C.M. et al. Australian Cancer Study (Ovarian Cancer) and the Australian Ovarian Cancer Study Group. Carbohydrate intake, glycemic load, glycemic index, and risk of ovarian cancer. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 6, p. 1332-1338, 2011.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Ovarian Epithelial Cancer Treatment**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/ovarianepithelial/HealthProfessional>>. Acesso em: 20 set. 2012.

NELSON, N.J. Studies on how lifestyle factors may affect breast cancer risk and recurrence. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 8, p. 574-576, 2012.

NICOLÁS DÍAZ-CHICO, B. et al. Androgens and androgen receptors in breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 105, p. 1-15, 2007.

NUSBAUM, R.; VOGEL, K.J.; READY, K. Susceptibility to breast cancer: hereditary syndromes and low penetrance genes. **Breast Diseases**, v. 27, p. 21-50, 2006-2007.

OLDENBURG, R.A. et al. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 63, n. 2, p. 125-149, 2007.

PAL, T. et al. Systematic review and meta-analysis of ovarian cancers: estimation of microsatellite-high frequency and characterization of mismatch repair deficient tumor histology. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6847-6854, 2008.

PAL, T.; PERMUTH-WEY, J.; SELLERS, T.A. A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. **Cancer**, v. 113, n. 4, p. 733-742, 2008.

PALMERO, E.I. et al. Clinical characterization and risk profile of individuals seeking genetic counseling for hereditary breast cancer in Brazil. **Journal of Genetic Counseling**, v. 16, p. 363-371, 2007.

PELTOMÄKI, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 6, p. 1174-1179, 2003.

PENA, S.D.J. et al. **DNA fingerprinting**: state of the science. Birkhäuser: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1993.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.

PLISIECKA-HAŁASA, J. et al. Loss of heterozygosity, microsatellite instability and TP53 gene status in ovarian carcinomas. **Anticancer Research**, v. 28, p. 989-996, 2008.

POWIERSKA-CZARNY, J. et al. Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer with the use of a well characterized multiplex system. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 4, p. 1195-1203, 2003.

PRAT, J. New insights into ovarian cancer pathology. **Annals of Oncology**, 2012. doi:10.1093/annonc/mds300.

RAMALHINHO, A.C.; FONSECA-MOUTINHO, J.A.; GRANADEIRO, L.A.T.G.B. Positive association of polymorphisms in estrogen biosynthesis gene, CYP19A1, and metabolism, GST, in breast cancer susceptibility. **DNA and Cell Biology**, v. 31, n. 6, p. 1100-1106, 2012.

REIS, F.J.C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário – papel dos marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 4, p. 222-227, 2005.

RISTOW, C.M.; YAMAMOTO, C.T.; FÁVARO, M. Fatores de risco e patogênese das neoplasias malignas epiteliais de ovário: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 185-195, 2006.

ROSAL, M.A.; SILVA, B.B. Evaluation of estrogen and progesterone receptors in non-neoplastic breast tissue of women of reproductive age exposed to tamoxifen and raloxifene: a randomized, double-blind study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 3, p. 797-801, 2011.

SCHUIJER, M.; BERNIS, E.M.J.J. TP53 and ovarian cancer. **Human Mutation**, v. 21, p. 285-291, 2003.

SCHWARZENBACH, H. et al. A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 9, 2007. 8 p.

SEITZ, H.K. et al. Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012. **Alcohol Alcohol**, v. 47, n. 3, p. 204-212, 2012.

SELLERS, T.A. et al. Estrogen bioactivation, genetic polymorphisms, and ovarian cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 2536-2543, 2005.

SERGEANTANIS, T.N.; ECONOMOPOULOS, K.P. GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 1, p. 195-202, 2010.

SHATALOVA, E.G. et al. Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. R909-921, 2005.

SHEN, K.L. et al. Microsatellite alterations on human chromosome 11 in in situ and invasive breast cancer: a microdissection microsatellite analysis and correlation with p53, ER (estrogen receptor), and PR (progesterone receptor) protein immunoreactivity. **Journal of Surgical Oncology**, v. 74, n. 2, p. 100-107, 2000.

SHULMAN, L.P. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): clinical features and counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch syndrome, Cowden syndrome, and Li-Fraumeni syndrome. **Obstetrics & Gynecology Clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 109-133, 2010.

SIGBJÖRNSDOTTIR, B.I. et al. Chromosome 8p alterations in sporadic and BRCA2 999del5 linked breast cancer. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, n. 5, p. 342-347, 2000.

SINGH, M.S.; FRANCIS, P.A.; MICHAEL, M. Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. **Breast**, v. 20, n. 2, p. 111-118, 2011.

SOOD, A.K. et al. Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 61, p. 4371-4374, 2001.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, 2003.

SUEBLINVONG, T; CARNEY, ME. Current Understanding of Risk Factors for Ovarian Cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 10, p. 67-81, 2009.

TAVASSOLI, FA; DEVILEE, P. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the breast and female genital organs**. 3. ed. Lyon: IARC, 2003.

THIAGALINGAM, S. et al. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. **Current Opinion in Oncology**, v. 14, n. 1, p. 65-72, 2002.

TOKUNAGA, E. et al. High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers. **Breast Cancer**, v. 19, n. 2, p. 161-169, 2012.

TORRESAN, C. et al. Genetic polymorphisms in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 2, p. 65-71, 2008.

TRAN, N. et al. Short tandem repeat polymorphism and cancer risk: influence of laboratory analysis on epidemiologic findings. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 12, p. 2133-2140, 2004.

TROISI, R. et al. Breast cancer incidence in Mongolia. **Cancer Causes and Control**, v. 23, n. 7, p. 1047-1053, 2012.

VAURS-BARRIÈRE, C. et al. Low frequency of microsatellite instability in BRCA1 mutated breast tumours. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, n. 10, 2000. 3 p.

WESTBERG, L. et al. Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 6, p. 2562-2568, 2001.

WOOSTER, R. et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 789-792, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/GLOBOCAN 2008. **Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: 15 set. 2012.

YOON, B.S. et al. Clinical significance of microsatellite instability in sporadic epithelial ovarian tumors. **Yonsei Medical Journal**, v. 49, n. 2, p. 272-278, 2008.

YOULDEN, D.R. et al. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. **Cancer Epidemiology**, v. 36, n. 3, p. 237-248, 2012.

ZHANG, W.; YU, Y.Y. Polymorphisms of short tandem repeat of genes and breast cancer susceptibility. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 33, n. 5, p. 529-534, 2007.

ZHANG, L. et al. Association of genetic polymorphisms of ER-alpha and the estradiol-synthesizing enzyme genes CYP17 and CYP19 with breast cancer risk in Chinese women. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 114, n. 2, p. 327-338, 2009.

ZHENG, W. et al. Population-based case-control study of CYP11A gene polymorphism and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 5, p. 709-714, 2004.

ZHU, W. et al. Microsatellite changes in nipple aspirate fluid and breast tissue from women with breast carcinoma or its precursors. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 8, p. 3029-3033, 2003.

5 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE

5.1 MANUSCRITO 1

Manuscrito intitulado “*Histological profile and age at diagnosis of breast and ovarian tumors: A register-based study in Espirito Santo, Brazil*”, publicado pela revista *Molecular and Clinical Oncology*.

Histological profile and age at diagnosis of breast and ovarian tumors: A register-based study in Espirito Santo, Brazil

ELDAMÁRIA DE VARGAS WOLFGRAMM¹, CAMILA FÁTIMA BIANCARDI GAVIOLI¹,
MAYARA LEMOS ENTRINGER¹, LYVIA NEVES REBELLO ALVES¹, ELAINE STUR¹,
ALLAN KARDEC DE CASTRO NETO², LUCIENE LAGE DA MOTTA³,
FAUSTO EDMUNDO LIMA PEREIRA¹ and IURI DRUMOND LOURO¹

¹Center of Molecular and Human Genetics, Department of Biology, Federal University of Espirito Santo, Vitória 29043-900; ²Pathology Laboratory, Santa Rita de Cássia Hospital, Vitória 29043-260; ³Pathology Laboratory, Santa Casa de Misericórdia de Vitoria Hospital, Vitória 29018-180, Espirito Santo, Brazil

Received September 18, 2012; Accepted October 29, 2012

DOI: 10.3892/mco.2012.38

Abstract. Breast and ovarian cancers are important public health problems in Brazil. However, in various locations in the Brazilian territory these types of cancer remain poorly characterized. Therefore, this study aimed to compare data collected from the Pathology Services of two Oncology Reference Hospitals in Espirito Santo state (Brazil) with the data in previous Brazilian studies. Histological type frequency and age at diagnosis of breast and ovarian tumors between 2001-2004 and 2009-2010 were analyzed. Tumor size, histological grade, lymph node status, hormone receptor status [estrogen (ER) and progesterone receptors (PR)] as well as HER2 and Ki-67 marker status were obtained for the cases of infiltrating ductal carcinomas of the breast during the period 2009-2010. Categorical variables were described by their absolute and/or relative frequencies, while quantitative variables were expressed as the mean \pm standard deviation and median, using 95% confidence intervals. Chi-square tests were performed to examine whether or not the studied variables differed by age at the time of diagnosis. Malignant breast tumors (1,758) and 119 malignant ovarian tumors were examined. Mean ages for malignant breast and ovarian tumors were 53.59 and 52.98 years, respectively. An increased tumor frequency in the age group of ≤ 35 years was observed for other malignant tumors of the breast during the period of 2009-2010, compared to 2001-2004. When considering only infiltrating ductal carcinomas with immunohistochemistry records available, there were 82.1% (133 cases)

of ER⁺/PR⁺ tumors, 1.9% (3 cases) of ER⁺/PR⁺/HER2³⁺ and 16.04% (26 cases) of ER⁺/PR⁺/HER2⁻ tumors. The findings of this study demonstrated detailed information concerning breast and ovarian tumor behavior in the Espirito Santo state (Brazil), allowing for a precise comparison with other populations (Brazilian or international), which may be helpful in the planning of prevention and treatment strategies.

Introduction

Breast cancer is the most common malignant tumor among women, accounting for one in four types of cancer diagnosed in women worldwide. Over 1.1 million women are diagnosed with this disease each year and incidence rates are still on the increase in several countries (1). In Brazil, breast cancer is an important public health problem, due to the high incidence, morbidity and mortality rates (1), which are unequally distributed throughout the country, with the South and Southeast constituting the regions with the highest reported breast cancer rates (2).

An incidence ratio of 52 breast cancer cases per 100,000 women is estimated in Brazil for 2012 (52,680 cases/year). The Southeast region has the highest incidence ratio of 69 new cases/100,000 women, while the South region has a similar incidence ratio of 65 cases/100,000 women (3). The Espirito Santo state, located in the Southeast region, has a breast cancer rate of 49.42/100,000 women for the year 2012, while the State's capital, Vitoria, a rate of 71.28/100,000 women (3). Recently, the Brazilian media reported significant increases in breast cancer incidence in women <35 years of age, generating public distress and concern (4).

Ovarian cancer is the fourth most frequent type of cancer in women. According to American studies, the risk ratio of developing ovarian cancer in a woman's life-time is estimated to be 1/70. The incidence increases with age, reaching its peak in the eighth decade (5).

During the period 2001-2005, the age-adjusted mortality rate due to ovarian cancer was 8.8/100,000 women per year in the United States (6). In Europe, various mortality rates

Correspondence to: Dr Iuri Drumond Louro, Center of Molecular and Human Genetics, Department of Biology, Federal University of Espirito Santo, Marechal Campos Avenue 1468, Maruípe, Vitória 29043-900, Espirito Santo, Brazil
E-mail: iurilouro@yahoo.com

Key words: breast and ovarian tumors, Brazil, epidemiology, histological data

have been reported. In Germany and the majority of western European countries, ovarian cancer incidence is almost 12/100,000 women, while it is lower in Southern Europe (9.3/100,000 women in Italy) and France (9.7/100,000 women). Total mortality due to ovarian cancer in Poland is 12.5/100,000 women, while the highest rate is reported in Northern Europe (13.9/100,000 women in Norway and 13.4/100,000 women in the UK) (7).

Ovarian cancer is also a public health problem in Brazil. Although not the most common type of female cancer, it constitutes a major cause of mortality among gynecological cancers (8). According to the estimations 5,530 Brazilian women were diagnosed with ovarian cancer in 2008, with 2,982 women succumbing to the disease (3.0/100,000 women) (9).

According to data obtained from the Brazilian National Cancer Institute (Instituto Nacional de Câncer, INCA), an incidence ratio of 6.17 cases per 100,000 women is estimated in Brazil for 2012 (6,190 cases/year). The Southeast region has demonstrated an estimated risk of 7 new cases per 100,000 women and the Espírito Santo state has demonstrated a previously reported rate of 5.92/100,000 women (3).

In an attempt to provide current data and a more comprehensive analysis of Brazilian breast and ovarian cancer epidemiology, this study aimed to examine histological type frequencies and age at the time of diagnosis for breast and ovarian tumors in Espírito Santo state, Brazil. Moreover, tumor size, histological grade, lymph node and hormone receptor status [estrogen (ER) and progesterone receptors (PR)] as well as HER2 and Ki-67 marker status for infiltrating ductal carcinomas, the most frequent malignant tumor of the breast, were investigated. Information was obtained after reviewing data from the Pathology Services of two Oncology Reference Hospitals in Espírito Santo state [the Santa Rita de Cássia and the Santa Casa de Misericórdia de Vitória Hospitals (Vitória, Brazil)].

Materials and methods

Data collection and categorization. Female breast and ovarian, malignant and benign tumor data accumulated during the period 2001-2004 in the Pathology Service of the Santa Casa de Misericórdia de Vitória Hospital as well as for 2001-2004 and 2009-2010 in the Pathology Service of the Santa Rita de Cássia Hospital were analyzed. Information concerning histological type and age at the time of diagnosis were obtained for the breast and ovarian tumors. Tumor size, histological grade, lymph node and hormone receptor status (ER/PR) as well as HER2 and Ki-67 marker status were obtained for infiltrating ductal carcinomas of the breast during 2009-2010 in the Santa Rita de Cássia Hospital.

Breast tumors were categorized into infiltrating ductal carcinomas, carcinomas, other malignant tumors, fibroadenomas and other benign tumors. Ovarian tumors were categorized into serous cystadenocarcinomas, mucinous cystadenocarcinomas, carcinomas, other malignant tumors, serous cystadenomas, mucinous cystadenomas, teratomas and other benign tumors. Immunohistochemical analysis of ER, PR and HER2 gene products was used to categorize tumors as luminal (ER+/PR+), HER2 (ER/PR/HER2 3+) and triple-negative (ER/PR/HER2-).

Patients that sought medical assistance at the studied Hospitals are representative of the entire population of Espírito Santo state with regard to breast and ovarian cancer, since the two hospitals are Cancer Reference Hospitals for the residents of the surrounding urban and rural regions.

Statistical analysis. The SPSS version 17.0 and GraphPad Prism 5 were used for data handling and statistical analyses. For the descriptive analysis, categorical variables were described by their absolute and/or relative frequencies, and quantitative variables were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) and median, using 95% confidence intervals (CI). Chi-square tests were performed to examine whether or not the studied variables differed among the age groups ≤ 35 , ≥ 36 to ≤ 55 and ≥ 56 years. This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Espírito Santo (Vitória, Brazil; protocol no. 02/09), including the informed consent waiver, and was performed in compliance with the Ethical Standards of the Declaration of Helsinki in 1975.

Results

Distribution of breast tumors by histological type and their correlation to age. There were 1,758 malignant, 2,570 benign and 21 phyllodes tumors of the breast during the period analyzed. Infiltrating ductal carcinoma was the most frequent malignant tumor (81.74%), responsible for 33.04% (1,437 cases) of the breast tumor cases (Table I).

The mean age at diagnosis for malignant breast tumors was 53.59 years (SD, 13.29; 95% CI, 52.96-54.21), with a median age of 52 years (range 14-101), respectively, accounting for 15.1% of the cases (266 cases; 95% CI, 13.43-16.77) <40 and 2.1% of the cases (37 cases; 95% CI, 1.43-2.77) <30 years. When considering only cases ≤ 35 years (126 cases), a mean age of 31.38 (SD, 3.66; 95% CI, 30.83-32.12) and a median age of 32 years were observed, accounting for 70.63% of the cases (89 cases; 95% CI, 62.68-78.58) >30 years. The distribution of breast tumors by histological type and their correlation to age are described in Table I.

Frequency of breast tumors. Breast tumor frequency in the age groups ≤ 35 , 36-55 and ≥ 56 years is shown in Fig. 1. A statistically significant higher frequency of infiltrating ductal carcinomas was observed in the 36-55 ($P<0.0001$) and ≥ 56 year ($P<0.0001$) age groups during 2009-2010, compared to 2001-2004 (Fig. 1B and C). Additionally, a higher frequency was observed for other malignant tumors in the age groups analyzed ($P=0.0172$, $P=0.0011$ and $P<0.0001$ for the groups ≤ 35 , 36-55 and ≥ 56 years, respectively) (Fig. 1A-C). No additional significant frequency differences were observed for carcinomas of the breast in the age groups during the time periods analyzed.

Fibroadenomas developed less frequently in the age groups ≤ 35 and 36-55 years ($P<0.0001$ for both groups) during 2009-2010, when compared to 2001-2004 (Fig. 1A and B). Similarly, other benign tumors of the breast developed less frequently in the age group ≤ 35 years ($P<0.0001$) during 2009-2010 compared to 2001-2004 (Fig. 1A).

Frequency and histological characteristics of infiltrating ductal carcinomas. The histological characteristics of the

Table I. Distribution of breast and ovarian tumors by histological type and their correlation to age.

Lesion site	Histological type	No.	Age (years)				
			Mean	SD	Median	Minimum	Maximum
Breast	Infiltrating ductal carcinoma	1,437	53.42	13.265	51.00	19	101
	Lobular	59	54.64	11.011	52.00	37	87
	Tubular/cribiform	54	51.25	10.804	51.00	31	79
	Mucinous/colloid	28	57.79	15.337	56.00	37	92
	Papillary	44	60.30	18.918	62.50	14	89
	Other malignant tumors	136	52.39	12.850	52.50	14	82
	Fibroadenoma	996	31.95	13.068	30.00	8	84
	Other benign tumors	1,574	44.33	13.600	45.00	5	88
	Phyllodes	21	45.00	13.791	49.00	12	63
	Total	4,349	44.93	15.996	45	5	101
Ovary	Serous cystadenocarcinoma	21	50.95	14.733	49.00	30	85
	Mucinous cystadenocarcinoma	5	60.00	8.426	56.00	53	71
	Carcinoma	9	56.89	15.358	51.00	42	82
	Other malignant tumors	84	53.25	16.721	57.50	16	89
	Serous cystadenoma	183	44.87	14.845	44.00	13	87
	Mucinous cystadenoma	56	45.48	14.266	46.00	17	85
	Teratoma	124	37.02	14.969	36.00	3	77
	Other benign tumors	1,015	42.08	11.618	43.00	3	97
	Total	1,497	43.40	13.181	44	3	97

SD, standard deviation.

infiltrating ductal carcinomas registered in the Santa Rita de Cássia Hospital during 2009-2010 are described in Table II. Undifferentiated tumors (grade III) comprised 9.4% (10 cases) in the age group ≤ 35 years, 49.1% (52 cases) in the age group 36-55 years and 41.5% (44 cases) in the age group ≥ 56 years.

With regard to hormone receptors, 38.9% (21 cases) were ER⁺, 6.7% (9 cases) were ER⁻, 37% (20 cases) were PR⁺ and 18.5% (10 cases) were PR⁻ in the age group ≤ 40 years, while 38.7% (86 cases) were ER⁺, 11.3% (25 cases) were ER⁻, 33.8% (75 cases) were PR⁺ and 15.3% (34 cases) were PR⁻ in the age group ≥ 50 years. For the age group ≤ 35 years, 2.60% (5 cases) were ER/PR⁺ and 4.69% (9 cases) were ER⁺/PR⁺.

Regarding HER2 expression, 80% (8 cases) of the HER2 3⁺ cases (overexpression cases) were diagnosed in the age group 36-55 years. Concerning the Ki-67 marker, ~50% (93 cases) of the positive cases were diagnosed in the age group 36-55 years.

We observed 82.1% (133 cases) of luminal tumors, 1.9% (3 cases) of HER2 tumors and 16.04% (26 cases) of triple-negative tumors. A statistically significant trend towards triple-negative tumors was observed in the age group ≤ 35 years ($P=0.0360$).

Distribution of ovarian tumors by histological type and their correlation to age. Concerning ovarian tumors, 119 malignant and 1,378 benign tumors (including cysts) were examined (Table I). The mean age for women with ovarian cancer was 52.98 years (SD, 15.634; 95% CI, 50.14-55.82), with a median age of 53 years, ranging from 16 to 89 years,

respectively, accounting for 58.8% of the cases (70 cases; 95% CI, 49.96-67.64) of ≥ 50 years. With regard to the benign tumors of the ovary, the mean age was 42.14 years (SD, 12.666; 95% CI, 41.46-42.81), with a median age of 43 years, ranging from 3 to 97 years, respectively.

Frequency of ovarian tumors. Among ovarian tumors, mucinous cystadenocarcinomas had the highest mean age at diagnosis (60 years; SD, 8.426), while teratomas the lowest (37.02 years; SD, 14.969) (Table I). A higher frequency was observed for other malignant tumors of the ovary and serous cystadenomas in the age group ≥ 56 years ($P=0.0151$ and $P=0.0255$, respectively) during the period 2009-2010 compared to 2001-2004 (Fig. 1F).

Discussion

This study investigated the histological type frequency and the age at the time of diagnosis of breast and ovarian tumors in the Espírito Santo state, Brazil. Samples were obtained from two Oncology Reference Hospitals. Breast and ovarian cancer histological types were similar for the two Hospitals. However, the Santa Rita de Cássia Hospital had a significantly larger number of cancer cases, justifying the collection of data for 2009-2010 only from this Hospital.

Data regarding tumor size, histological grade, lymph node status and hormone receptor status as well as HER2 and Ki-67 marker status for infiltrating ductal carcinomas

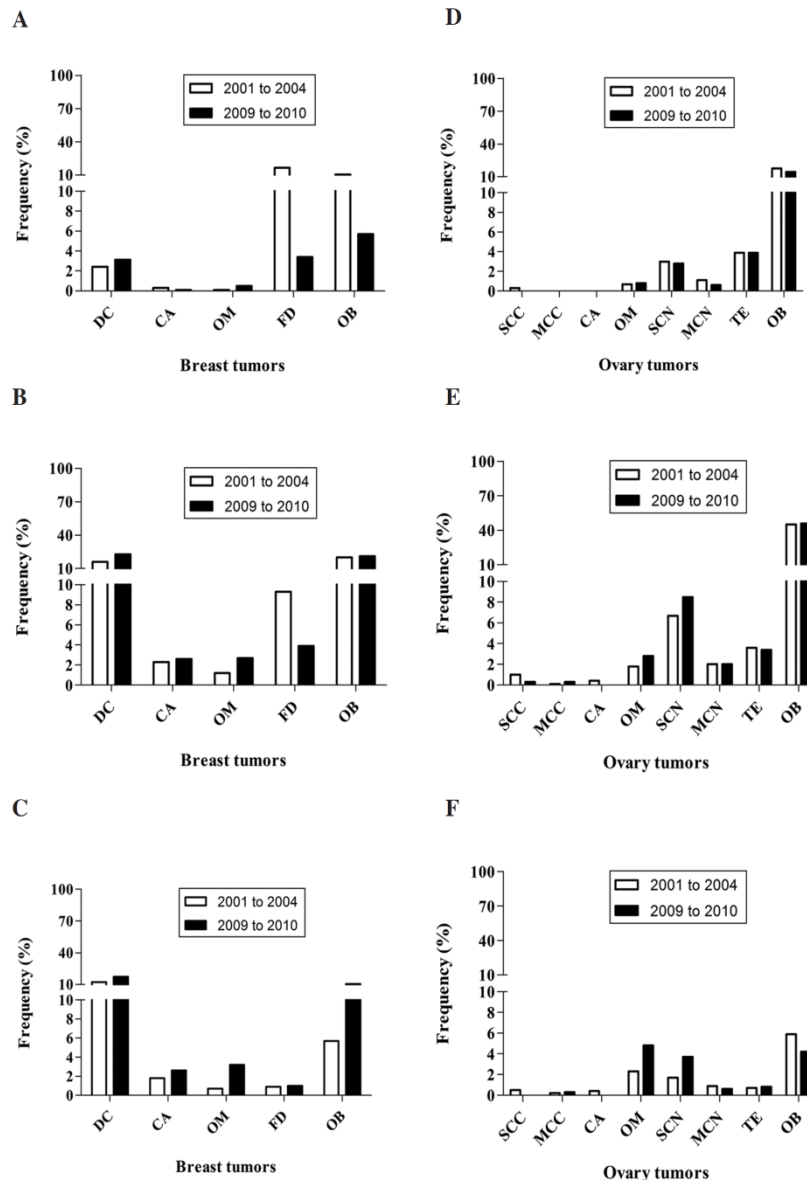


Figure 1. Frequency of breast and ovarian tumors registered in the Pathology Services. (A and D) Age group ≤ 35 years, (B and E) age group 36-55 years, (C and F) age group ≥ 56 years. (A-C) Breast tumors, (D-F) ovarian tumors. DC, infiltrating ductal carcinoma; CA, other carcinomas; OM, other malignancies; FD, fibroadenoma; OB, other benign tumors; SCC, serous cystadenocarcinoma; MCC, mucinous cystadenocarcinoma; SCN, serous cystadenoma; MCN, mucinous cystadenoma; TE, teratoma.

were available only for the time period 2009-2010, due to the lack of information for previous years and for other types of malignant tumors.

The mean age at diagnosis for malignant breast tumors in our study was similar to that of another study analyzing samples from Florianópolis (Santa Catarina, Brazil) (10). By contrast, our results demonstrated a lower mean and median age at diagnosis when compared with cases from Juiz de Fora (Minas Gerais, Brazil) (11). The age group of ≤ 35 years also presented results similar those of the study conducted with samples obtained from Florianópolis (12). Frequencies observed in the age groups ≤ 30 and ≤ 40 years were different

from the frequencies described in the literature, reporting $\sim 0.6\%$ of cancer cases in women < 30 years and 6.5% in women < 40 years (13).

The fact that the cancer rates were higher during 2009-2010 when compared to 2001-2004 was consistent with a Brazilian study conducted examining samples from Goiânia (Goiás, Brazil) (4). According to this study (4), a significant increase in breast cancer incidence was observed in the age groups (20-39, 40-59 and ≥ 60 years) over the years analyzed (1988-2003). This increase in breast cancer rates may be due to an improvement in cancer screening programs resulting from a wider clinical application of mammography.

Table II. Histological characteristics of infiltrating ductal carcinomas during 2009-2010.

Histological characteristics	n (% , 95% CI)
Histological grade	317
I	14 (4.4, 2.1-6.7)
II	197 (62.1, 56.8-67.4)
III	106 (33.4, 28.2-38.6)
Tumor size, right breast	51
T1	37 (72.5, 60.2-84.8)
T2	12 (23.5, 11.9-35.1)
T3	2 (3.9, 0.0-9.2)
Tumor size, left breast	61
T1	40 (65.6, 53.7-77.5)
T2	17 (27.9, 16.6-39.2)
T3	4 (6.6, 0.4-12.8)
Tumor size, without location	154
T1	107 (69.5, 62.2-76.8)
T2	42 (27.3, 20.3-34.3)
T3	5 (3.2, 0.4-5.9)
Lymph node status	379
Positive	104 (27.4, 22.9-31.9)
Negative	275 (72.6, 68.1-77.1)
ER status	195
Positive	152 (77.9, 72.1-83.7)
Negative	43 (22.1, 16.3-27.9)
PR status	192
Positive	139 (72.4, 66.1-76.7)
Negative	53 (27.6, 21.3-33.9)
HER2 status	35
1+	14 (40, 23.8-56.2)
2+	11 (31.4, 16.0-46.8)
3+	10 (28.6, 13.6-43.6)
Ki-67 status	187
Positive	186 (99.5, 98.5-100.5)
Negative	1 (0.5, 0.0-1.5)

CI, confidence interval; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.

Infiltrating ductal carcinomas demonstrated no statistically significant differences in histological grade, lymph node involvement and tumor size in the age groups. These results are consistent with a study using samples from Ribeirão Preto (São Paulo, Brazil) (13), where no differences in histopathological tumor features were observed in the age groups ≤ 40 , 40-50 and ≥ 50 years at diagnosis. By contrast, a study analyzing samples of invasive ductal breast cancer in Belém (Pará, Brazil) (14) provided different results. That study reported 59.1% T4 tumors (26 cases), 93.2% of locally advanced disease at diagnosis (41 cases; T3 and T4 tumors) and 93.2% of clinically affected lymph nodes (41 cases) (14), while the present

study observed 4.14% T3 tumors (11 cases; 95% CI, 1.75-6.53) and 27.4% lymph node-positive tumors (104 cases; 95% CI, 22.91-31.89). The higher rates observed in the study conducted using samples from Belém (14) are likely to be due to the fact that the patients had advanced disease at diagnosis, as they were undergoing pre-surgical neoadjuvant chemotherapy. However, the samples analyzed in the present study accounted for all the tumor patients admitted to the Santa Rita de Cassia Hospital Pathology Service.

In contrast to other Brazilian studies, no statistically significant differences were observed in hormone receptor expression in the analyzed age groups. Studies using samples from Ribeirão Preto (13) demonstrated that PR⁺ tumors were less frequent in women aged ≤ 40 years compared to women aged ≥ 50 years (36.2% or 21 cases vs. 58.4% or 38 cases), while studies using samples from Florianópolis (12) found 38.9% (35 cases) ER⁻/PR⁻ and 24.5% (22 cases) ER⁺/PR⁺ tumors in the age group ≤ 35 years.

HER2 overexpression in the present study was similar to other studies in the literature, where HER2 was overexpressed in ~15-25% of the breast cancers (14). When comparing patients aged ≥ 50 years to those aged ≤ 50 years, no statistically significant differences were observed in the HER2 expression. Similar results were observed in samples from Ribeirão Preto (13). The luminal immunohistochemical profile observed in our study (82.1%; 95% CI, 76.20-88.0%) was higher compared to results of other studies available in the literature (60-70%) (15), as well as compared to the Brazilian sample reported by Bacchi *et al* (15), reporting a luminal profile percentage of 68.21% (249 cases). By contrast, although consistent with our results, in their study Bacchi *et al* (15) also observed a trend towards triple-negative profile in the younger age group (27.1%, 79 cases).

The mean age at diagnosis observed for malignant ovarian tumors in the present study was consistent with that of a Brazilian study using samples from São Paulo (São Paulo) (16) which reported a mean age at diagnosis of 53.5 years, accounting for 58.8% of the patients > 50 years of age. The mean age for malignant ovarian tumors was also in concordance with the findings of a study using samples from Jundiaí (São Paulo, Brazil) (17), reporting a mean age of 55 years at diagnosis for malignant ovarian tumors.

In their study, DeLand *et al* (18) reported a mean age at diagnosis for malignant ovarian tumors (50 years) that was similar to the findings of the present study, although the mean age for benign tumors (34 years) was lower compared to the one we detected.

Breast and ovarian tumors are poorly characterized epidemiologically in several Brazilian regions, thus this study adds considerably to other Brazilian studies, providing detailed information about the Espírito Santo state. Improved knowledge on these tumors may have direct implications on the prevention, diagnosis and treatment strategies in Brazil and other countries.

Acknowledgements

This study was funded in part by Fibria Celulose. EVW was supported by a FAPES PhD scholarship. CFBG, MLE, LNRA and ES were supported by a CNPq scholarship.

References

1. Ashton-Prolla P, Giacomazzi J, Schmidt AV, Roth FL, Palmero EI, Kalakun L, Aguiar ES, Moreira Susana M, Batassini E, Belo-Reyes V, Schuler-Faccini L, Giugliani R, Caleffi M and Camey SA: Development and validation of a simple questionnaire for the identification of hereditary breast cancer in primary care. *BMC Cancer* 9: 283-291, 2009.
2. Palmero EI, Ashton-Prolla P, Rocha JCC, Vargas FR, Kalakun L, Blom MB, Azevedo SJ, Caleffi M, Giugliani R and Schuler-Faccini L: Clinical characterization and risk profile of individuals seeking genetic counseling for hereditary breast cancer in Brazil. *J Genet Couns* 16: 363-371, 2007.
3. National Cancer Institute: United States-Latin America Cancer Research Network (US-LA CRN): US-LA CRN Partner: Brazil. <http://www.cancer.gov/aboutnci/organization/olacpd/crn/brazil>. Accessed, 2011.
4. Freitas R Jr, Freitas NM, Curado MP, Martins E, Silva CM, Rahal RM and Queiroz GS: Incidence trend for breast cancer among young women in Goiânia, Brazil. *Sao Paulo Med J* 128: 81-84, 2010.
5. Schuijjer M and Berns EM: TP53 and ovarian cancer. *Hum Mutat* 21: 285-291, 2003.
6. Medeiros LR, Rosa DD, da Rosa M and Bozzetti MC: Accuracy of CA 125 in the diagnosis of ovarian tumors: a quantitative systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 142: 99-105, 2009.
7. Dansonka-Mieszkowska A, Ludwig AH, Kraszewska E and Kupryjanczyk J: Geographical variations in TP53 mutational spectrum in ovarian carcinomas. *Ann Hum Genet* 70: 594-604, 2006.
8. Appel M, Mõnego H, Ramos JGL, Poli MEH, Stein AT, Silva JM, Bernd FF and Bersh GP: Screening and diagnosis of ovarian cancer. *Rev AMRIGS* 53: 313-318, 2009 (In Portuguese).
9. World Health Organization: International Agency for Research on Cancer: GLOBOCAN 2008: Summary statistics, Brazil. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=76#KEY>. Accessed January 9, 2012.
10. Schneider IJ and d'Orsi E: Five-year survival and prognostic factors in women with breast cancer in Santa Catarina state, Brazil. *Cad Saude Publica* 25: 1285-1296, 2009 (In Portuguese).
11. Guerra MR, Mendonça GA, Bustamante-Teixeira MT, Cintra JR, Carvalho LM and Magalhães LM: Five-year survival and prognostic factors in a cohort of breast cancer patients treated in Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil. *Cad Saude Publica* 25: 2455-2466, 2009 (In Portuguese).
12. Crippa CG, Hallal ALC, Dellagiustina AR, Traebert EE, Gondin G and Pereira C: Clinical and epidemiological profile of breast cancer in young women. *ACM Arq Catarin Med* 32: 50-58, 2003 (In Portuguese).
13. Clagnan WS, Andrade JM, Carrara HH, Tiezzi DG, Reis FJ, Marana HR and Abrão RA: Age as an independent factor of prognosis in breast cancer. *Rev Bras Ginecol Obstet* 30: 67-74, 2008 (In Portuguese).
14. Brito NMB, Sampaio PCM, Castro AAH and Oliveiras MR: Clinical characteristics of women with invasive ductal breast carcinoma undergone neoadjuvant chemotherapy. *Rev Para Med* 21: 37-41, 2007 (In Portuguese).
15. Bacchi LM, Corpa M, Bacchi CE and Carvalho FM: Pathological and molecular characterization of breast carcinomas of young women. *Rev Bras Mastol* 19: 42-46, 2009 (In Portuguese).
16. Fernandes LRA, Lippi UG and Baracat FF: Ovarian tumor risk index incorporating age, ultrasound and CA-125. *Rev Bras Ginecol Obstet* 25: 345-351, 2003 (In Portuguese).
17. Luiz BM, Miranda PF, Maia EMC, Machado RB, Giatti MJL, Filho AA and Borges JBR: Epidemiological study of ovary tumor patients in the city of Jundiaí from June 2001 to June 2006. *RBC* 55: 247-253, 2009.
18. DeLand M, Fried A, van Nagell JR and Donaldson ES: Ultrasonography in the diagnosis of tumors of the ovary. *Surg Gynecol Obstet* 148: 346-348, 1979.

5.2 MANUSCRITO 2

Manuscrito intitulado “*Analysis of genome instability in breast cancer*”, publicado (*Online first*) pela revista *Molecular and Biology Reports*.

.

Analysis of genome instability in breast cancer

Eldamária de Vargas Wolfgramm · Lyvia Neves Rebello Alves ·
Elaine Stur · Thaís Tristão Tovar · Mariana Penha De Nadai Sartori ·
Allan Kardec de Castro Neto · Iúri Drumond Louro

Received: 17 June 2012 / Accepted: 19 November 2012
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract Breast cancer is a heterogeneous disease, previously associated with genomic instability. Our aim was to analyze microsatellite markers in order to determine patterns and levels of instability, as well as possible correlations with histopathological parameters. Polymerase chain reaction was used to characterize microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) in 107 breast carcinomas at twelve microsatellite loci. Some of the markers were selected because of their relation to steroid hormone metabolism, which seems to be related to sporadic breast cancer risk. D5S346 and D17S250 markers showed a statistically significant frequency of MSI. LOH in D3S1611, D17S250, AR and ER- β were associated with some parameters of worse prognosis. Marker group analysis showed that CYP19, AR and ER- β were related to histological grade III, ER-negative and PR-negative cases. Our results suggest that marker group analysis may be preferred to the single marker strategy, being predictive of worst prognosis when single markers are unable to provide such information. A further evaluation of steroid metabolism genes and their association with low penetrance genes in breast cancer may be useful.

Keywords Genomic instability · MSI · LOH · Steroid metabolism · Breast cancer

Introduction

Breast cancer remains as a major health problem for women. It is the most common female cancer, accounting for one in four cancers diagnosed in women worldwide. More than 1.1 million women are diagnosed every year with this disease and incidence rates are still increasing in many countries [1].

Various genetic and environmental factors have been established as causes of breast cancer, which often shows diverse clinical presentation, pathological features and outcome, reflecting a complex etiology [2].

Genetic variability in short tandem repeat sequences (STR) have been reported in several tumor types, including breast cancer. STRs are defined as highly polymorphic repeat regions of one to six nucleotide units [3], where repeat expansion or contraction may be more likely to occur in tumors than in normal tissues, being referred to as microsatellite instability or MSI [4]. MSI was first described in 1993 in colorectal cancers [4] and has been studied in other tumors since then. The mechanisms causing MSI in sporadic tumors have not been completely elucidated and may possibly involve genes or pathways different from those implicated in the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC), in which MSI occurs due to germ-line mutation in mismatched repair DNA genes (MMR) [5, 6].

Polymorphic microsatellite loci analysis also allows for the detection of loss of heterozygosity (LOH) in tumor cells, a mechanism by which tumor cells lose protective genes. LOH can only be assessed in heterozygous loci and it is thought to confer a growth advantage to tumor cells [7, 8].

E. de Vargas Wolfgramm · L. N. R. Alves · E. Stur ·
T. T. Tovar · M. P. De Nadai Sartori · I. D. Louro (✉)
Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de
Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais,
Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos,
1468, Campus de Maruípe, Vitória, ES 29040-090, Brazil
e-mail: iurilouro@yahoo.com

A. K. de Castro Neto
Serviço de Patologia, Hospital Santa Rita de Cássia,
Avenida Marechal Campos, 1579, Santa Cecília,
Vitória 29043-260, ES, Brazil

In this study, we examined the levels and patterns of MSI and LOH in 107 breast carcinomas at twelve microsatellite loci to identify a correlation between these events and several histopathological parameters. Some markers were chosen because they are inside genes related to steroid hormone metabolism, which seems to be associated with sporadic breast cancer risk and because MSI and LOH were not studied in these regions yet.

Materials and methods

Samples

Archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues from 107 breast cancer samples were obtained from the Department of Pathology of the Santa Rita de Cássia Hospital, Espírito Santo State, Brazil, during years 2009 and 2010. Patients presented a mean age of 55.91 years and a median of 56.00 years, ranging from 28 to 89 years (*Standard Deviation* = 13.083). Histologically, 93 specimens were infiltrating ductal carcinomas (IDC) and 14 specimens were other breast carcinomas. Tumor samples were collected by 3 mm punches of tumor blocks. Briefly, histology slides were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tissues, stained with hematoxylin/eosin, and allowed to air dry. Tumor tissue was marked in hematoxylin/eosin stained slides by the pathologist and aligned with the respective sample block, so that the punch could be taken. Normal tissue control was also obtained from every block.

DNA extraction and microsatellite analysis

DNA was extracted from 0.5 mm slices of the punch, by incubating at 58 °C for 5 days in 0.5 M Tris, 0.02 M EDTA, 0.01 M NaCl, 1 mg/ml proteinase K and 2 % SDS and subsequently submitted to organic extraction with phenol-chloroform. Finally, samples were eluted in 100 µl of 3 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM EDTA-NaOH (pH 8.0).

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in Eppendorf Mastercycler® and Applied Biosystems Veriti® thermal cyclers. Microsatellite markers and their respective primers are shown in Table 1. PCR was performed in simplex reactions with a final volume of 15 µl and in cycling conditions specific to each primer. PCR mixtures containing 1× PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)) of the Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 4–10 ng of genomic DNA, 0.5–1.0 µM each primer, 0.2 mM of each dinucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl₂ and 0.6 units of Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Amplified fragments were resolved in 15 % polyacrylamide gels at 160 V for 15 h and visualized after silver staining. MSI was recognized when an expansion or a contraction in one or both tumor DNA alleles was detected when compared with normal tissue alleles.

LOH was assessed when a reduction in at least 50 % of the signal intensity from one allele was detected in tumor DNA as compared with the respective normal DNA. Positive cases were reamplified for result confirmation.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Espírito Santo (protocol number CEP-002/09).

Statistical analysis

The statistical tests were conducted with SPSS version 17.0 and EpiInfo version 3.5.1. Comparisons between MSI/LOH with clinicopathological parameters were performed using Fisher's exact test and Odds Ratio (OR) with 95 % confidence intervals (CI). A significance value of $p < 0.05$ was used for all analyses.

Results

Genomic instability analysis

A total of 49 MSI or LOH were found in 107 breast tumors. The highest frequencies of MSI were observed for D5S346 and D17S250, being 2 % the average MSI frequency for all markers (0–6 % range). D8S135 showed the highest LOH frequency, being 5 % the average LOH frequency (0–17 % range).

Considering positivity at only one locus, frequencies of 10 and 16 % were found for MSI and LOH respectively (MSI: 11/107; CI 4.3–15.7; LOH: 17/107; CI 9.1–22.9). Considering positivity at two loci, frequencies of MSI and LOH were, 2 % (2/107; CI 0.0–4.7) and 3 % (3/107; CI 0.0–6.2), respectively. At three or more loci, MSI frequency dropped to 0 % (0/107), while LOH frequency was 1 % (1/107; CI 0.0–2.9).

Genomic instability characteristics and the number of informative cases for each marker are described in Table 2.

Correlation between MSI/LOH and clinicopathological parameters

Correlation between age at diagnosis, histological type, histological grade, hormonal receptor status (ER and PR), HER2 and Ki-67 marker status and frequency of MSI/LOH for each marker was investigated and summarized in Fig. 1.

Table 1 Microsatellites markers used for analysis of MSI and LOH in breast carcinomas

Marker	Chromosome localization	Repeat motif	Primer sequences (forward and reverse)
CYP19	15q21.1	(TTTA) _n	5'-AGCAGGTACTTAGTTAGCTACAATC-3' 5'-CTGGGTGATAGAGTCAGAGC-3'
CYP11	15q24.1	(TAAAA) _n	5'-CGACGAGGATTAGGGTTCCA-3' 5'-CGTCTTAGTTATGGCCCCACT-3'
AR	Xq11-12	(CAG) _n	5'-CGCGAAGTGATCCAGAACCC-3' 5'-ATGGGCTTGGGGAGAACCAT-3'
ER- α	6q25-27	(TA) _n	5'-AGACGCATGATATACTTCACC-3' 5'-GTTCACTTGGGCTAGGATAT-3'
ER- β	14q23-24	(CA) _n	5'-CATTGCCATACACAGAGGT-3' 5'-GCCTGGCCTAAAGAAGAATA-3'
D8S135	8p21.3	(GA) _n	5'-GGCAACAGAGTGGGACTTGAT-3' 5'-ATAGATCCAAAATGTTCCCCCAATGG-3'
D10S197	10p12	(CA) _n	5'-ACCACTGCACCTTCAGGTGAC-3' 5'-CTCAAGTGGCATTGTGAAATCTTCGAAC-3'
UGT1A1	2q37	(TA) _n	5'-AGCTCCACCTTCTTTATCTCTGAAAG-3' 5'-TTTGCTCCTGCCAGAGGTTTC-3'
D3S1611	3p21.3	(CA) _n	5'-GCCGGGTACATTGGCCTGTAATC-3' 5'-AGCTGAGACTACAGGCATTTGCC-3'
D5S345	5q21	(CA) _n	5'-ACTCACTCTAGTGATAAAATCGGG-3' 5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'
D17S250	17q11.2-12	(CA) _n	5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3' 5'-GCTGGCCATATATATTTAAACC-3'
D2S119	2p21	(CA) _n	5'-CTTGGGGAACAGAGGTCATTCTCAT-3' 5'-CCTTACGAGAATCCCTCAATTTCTTTGG-3'

Table 2 Frequencies of MSI and LOH for twelve markers analyzed in breast carcinomas

Marker	MSI/informative case (frequencies)	<i>p</i> value	LOH/informative case (frequencies)	<i>p</i> value
CYP19	2/101 (2 %)	0.6810	3/69 (4 %)	1.0000
CYP11	1/85 (1 %)	1.0000	2/53 (4 %)	1.0000
AR	0/94 (0 %)	0.3915	4/85 (5 %)	1.0000
D8S135	1/101 (1 %)	1.0000	6/35 (17 %)	0.0047
D10S197	1/86 (1 %)	1.0000	1/65 (2 %)	0.3546
UGT1A1	0/88 (0 %)	0.3880	2/29 (7 %)	0.6458
D2S119	1/72 (1 %)	1.0000	0/38 (0 %)	0.2478
D3S1611	0/105 (0 %)	0.2436	5/71 (7 %)	0.3755
ER- α	1/50 (2 %)	0.5763	1/21 (5 %)	1.0000
ER- β	0/66 (0 %)	0.6198	3/45 (7 %)	0.4739
D5S345	6/99 (6 %)	0.0036	2/83 (2 %)	0.4114
D17S250	4/73 (6 %)	0.0278	3/65 (5 %)	1.0000

We did not observe statistically significant correlations between MSI and clinicopathological parameters. In contrast, D3S1611 LOH presented a significant correlation with age at diagnosis ≤ 35 years ($p = 0.0227$), D17S250 LOH showed a correlation with histological grade III ($p = 0.0245$), AR and ER- β LOH were associated with ER negatives cases ($p = 0.0178$ and $p = 0.0056$, respectively), and ER- β LOH correlated with PR negative cases ($p = 0.0240$).

Marker combination analysis

In order to increase the efficiency of individual marker analysis, we examined markers in combinations and their possible correlation with breast cancer characteristics. Markers were selected according to their genomic instability frequencies.

We have found a significant association between genomic instability in marker group D3S1611/CYP11/ER- β /

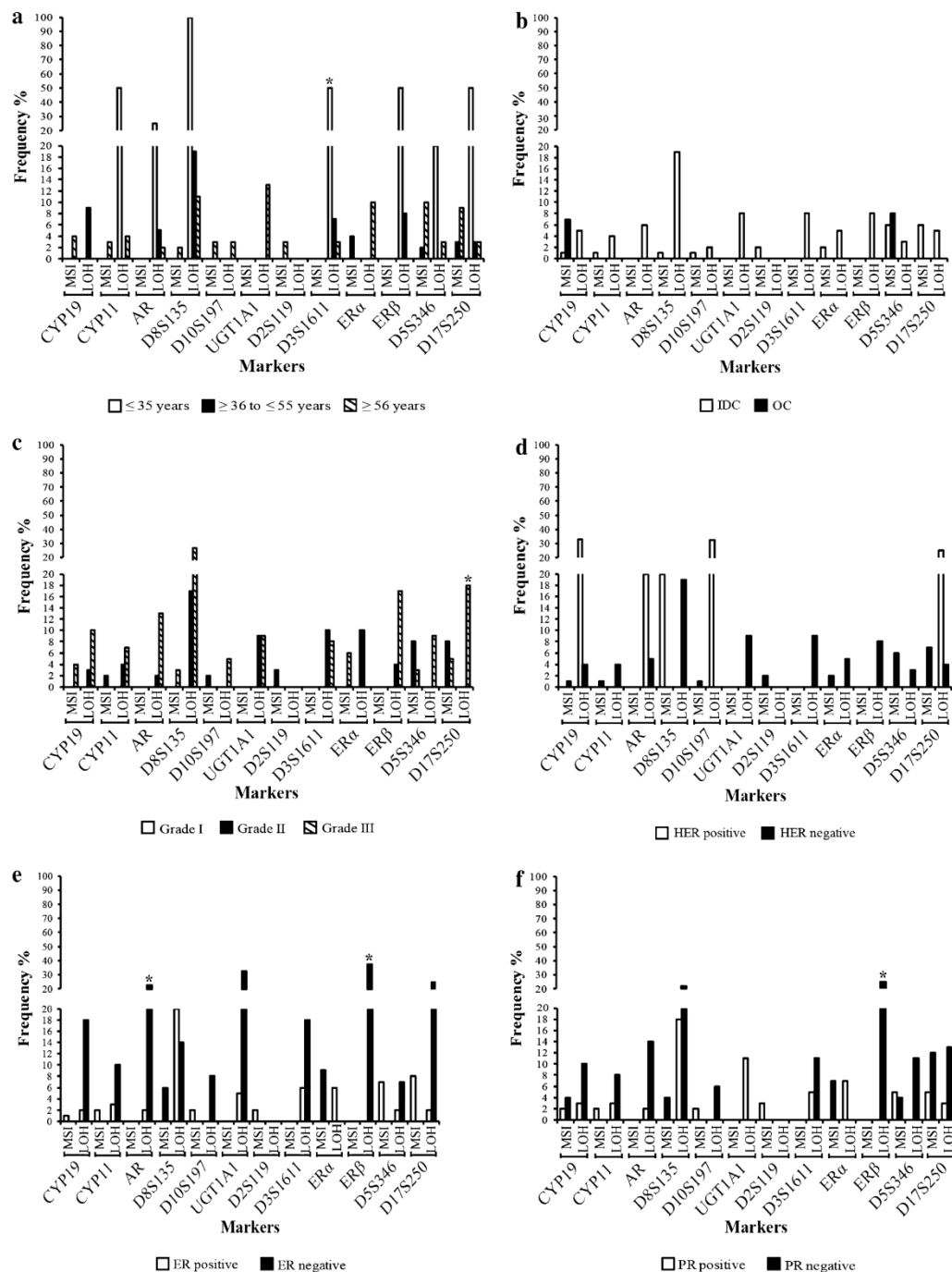


Fig. 1 MSI and LOH association with clinicopathological parameters *statistically significant frequency ($p < 0.05$) Marker frequencies in relation to: **a** age at diagnosis; **b** tumor histological type; **c** tumor

histological grade; **d** HER2 status; **e** ER status; **f** PR status. *IDC* infiltrating ductal carcinoma; *OC* other carcinomas of the breast

AR/D17S250 and age at diagnosis ≤ 35 years, as well as group D10S197/UGT1A1/D2S119/ER- α /D5S346 and age at diagnosis ≥ 56 years ($p = 0.0001$, OR = 12.16 and $p = 0.0048$, OR = 5.22, respectively). Genomic instability at group AR/D8S135/D3S1611/D17S250/ER- β was associated with IDC ($p = 0.0358$) and at group CYP19/AR/

UGT1A1/ER- β /D17S250 was associated with histological grade III ($p = 0.0011$, OR = 4.33). ER-negative cases were associated with group CYP19/AR/D10S197/D3S1611/ER- β and PR-negative cases correlated with group CYP19/AR/ER- β /D5S346/D17S250 ($p < 0.0001$, OR = 7.71 and $p < 0.0001$, OR = 5.51, respectively).

HER2 3 + tumors were associated with group CYP19/AR/D8S135/D10S197/D17S250 ($p = 0.0110$, OR = 4.81).

Discussion and conclusion

Breast cancer carcinogenesis is a complex multistep process associated with numerous genetic alterations, being genomic instability an important step in the molecular processes of tumorigenesis [9].

In this study, we have analyzed 107 tumors of the breast and found MSI at markers D5S346 ($p = 0.0036$) and D17S250 ($p = 0.0278$), however these were not associated with clinicopathological parameters. Our results suggest that MSI-L, defined as instability at <30–40 % of loci when more than five markers are used [4], are more likely to occur in breast cancer than MSI-H, which describes instability at ≥ 30 –40 % of loci [4]. Our observations are in agreement with Ando et al. [7], who showed a higher frequency of MSI-L in breast tumors. In comparison, Halford et al. [10] demonstrated that MSI-L is very infrequent in grade III ductal and lobular breast cancers and the study of Yee et al. [11] observed a higher frequency of MSI-H in breast cancers.

As opposed to MSI, LOH showed significant frequencies at markers D3S1611, D17S250, AR and ER- β , being related to some characteristics of worse prognosis, which was also described by other studies [12, 13].

In order to increase the efficiency of single marker analysis, we grouped markers according to their genomic instability frequencies and tested their correlation with clinicopathological parameters. Because of our selection criteria, AR, CYP19 and ER- β were included in almost all marker groups with significant results. Limiting our scope to these three markers, we have observed a correlation with histological grade III ($p = 0.0067$; OR = 5.98), ER-negative ($p = 0.0001$; OR = 13.19) and PR-negative tumors ($p = 0.004$; OR = 11.97). These three genes are related to the androgen hormone pathway, but the mechanism of testosterone action in female breast cancer is still unclear, as well as whether its effects are predominantly proliferative or anti-proliferative on breast cells at physiological levels [14]. Therefore, further studies are needed to evaluate the influence of these genes, especially in association with other low penetrance genes, in breast cancer.

In conclusion, we observed that MSI and LOH frequencies varied among markers, however, LOH was observed in a greater number of cases, especially for markers D3S1611, D17S250, AR and ER- β , which correlated with worse prognosis parameters. In addition, marker combination analysis showed that CYP19, AR and ER- β were related with histological grade III, ER-negative and

PR-negative cases, suggesting their use as markers of worse prognosis.

Acknowledgments Part of this study was sponsored by Fibria Celulose. E.V. Wolfgramm was supported by a FAPES doctorate scholarship. L. N. R. Alves, E. Stur, T. T. Tovar and M. P. D. N. Sartori were supported by a CNPq scholarships.

References

1. Ashton-Prolla P, Giacomazzi J, Schmidt AV, Roth FL, Palmero EI, Kalakun L, Aguiar ES, Moreira Susana M, Batassini E, Belo-Reyes V, Schuler-Faccini L, Giugliani R, Caleffi M, Camey SA (2009) Development and validation of a simple questionnaire for the identification of hereditary breast cancer in primary care. *BMC Cancer*. doi:10.1186/1471-2407-9-283
2. Conde J, Silva SN, Azevedo AP, Teixeira V, Pina JE, Rueff J, Gaspar JF (2009) Association of common variants in mismatch repair genes and breast cancer susceptibility: a multigene study. *BMC Cancer*. doi:10.1186/1471-2407-9-344
3. Kelkar YD, Strubczewski N, Hile SE, Chiaromonte F, Eckert KA, Makova KD (2010) What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. *Genome Biol Evol* 2:620–635
4. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998) A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58:5248–5257
5. Lee S, Berg KD, Sherman ME, Griffin CA, Eshleman JR (2001) Microsatellite instability is infrequent in medullary breast cancer. *Am J Clin Pathol* 115:823–827
6. Peltomäki P (2003) Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21:1174–1179
7. Ando Y, Iwase H, Ichihara S, Toyoshima S, Nakamura T, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Karamatsu S, Mitsuyama S, Fujii Y, Kobayashi S (2000) Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Lett* 156:207–214
8. Thiagalingam S, Foy RL, Cheng KH, Lee HJ, Thiagalingam A, Ponte JF (2002) Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Curr Opin Oncol* 14:65–72
9. Schwarzenbach H, Müller V, Beeger C, Gottberg M, Stahmann N, Pantel K (2007) A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer. *Breast Cancer Res*. doi:10.1186/bcr1772
10. Halford SE, Sawyer EJ, Lambros MB, Gorman P, Macdonald ND, Talbot IC, Foulkes WD, Gillett CE, Barnes DM, Akslen LA, Lee K, Jacobs IJ, Hanby AM, Ganesan TS, Salvesen HB, Bodmer WF, Tomlinson IP, Roylance RR (2003) MSI-low, a real phenomenon which varies in frequency among cancer types. *J Pathol* 201(3): 389–394
11. Yee CJ, Roodi N, Verrier CS, Parl FF (1994) Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res* 54:1641–1644
12. Tokunaga E, Okada S, Yamashita N, Akiyoshi S, Kitao H, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y (2012) High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers. *Breast Cancer* 19(2):161–169

13. Saleh EM, Wahab AH, Elhouseini ME, Eisa SS (2004) Loss of heterozygosity at BRCA1, TP53, nm-23 and other loci on chromosome 17q in human breast carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 16(1):62–68
14. Anghel A, Raica M, Marian C, Ursoniu S, Mitrasca O (2006) Combined profile of the tandem repeats CAG, TA and CA of the androgen and estrogen receptor genes in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 132(11):727–733

5.3 MANUSCRITO 3

Manuscrito intitulado “*Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in ovarian cancer: a study in the population of Espírito Santo, Brazil*”, formatado e aceito para publicação pela revista *Genetics and Molecular Research*, como pode ser verificado por aceite que se encontra ao final deste manuscrito.

Title Page

Authors

Lyvia Neves Rebello Alves¹ (L.N.R. Alves), Eldamária de Vargas Wolfgramm² (E.V. Wolfgramm), Allan Kardec de Castro Neto² (A.K. de Castro Neto) and Iúri Drumond Louro¹ (I.D. Louro)

Title

Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in ovarian cancer: a study in the population of Espírito Santo, Brazil.

Running title

Genome instability in ovarian cancer, ES, Brazil.

Institutional addresses

¹Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

²Serviço de Patologia, Hospital Santa Rita de Cássia, Vitória, Espírito Santo, Brazil

Corresponding author:

Iúri Drumond Louro

Mailing address: Av. Marechal Campos, 1468 - Campus de Maruípe, 29040-090 - Vitória - ES - Brazil

Tel.: +55-27-3335.7493; Fax: +55-27-3335.7250

E-mail: iurilouro@yahoo.com

ABSTRACT

Ovarian cancer is currently the most lethal gynecological malignancy in women and it is a heterogeneous and cytogenetically complex disease previously associated with genomic instability. Our purpose was to analyze microsatellite markers in order to determine patterns and levels of instability, as well as possible correlations with histopathological parameters. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to characterize microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) in 24 ovarian tumors at twelve microsatellite loci. A total of 11 samples presented MSI or LOH. In this study only MSI-L was found. Markers D5S346 and CYP11 showed the highest MSI and LOH frequencies. D17S250 LOH was significantly associated with tumor histological type ($p=0.0003$), and ER α was associated with tumor histological type when a combined analysis of LOH and MSI was performed ($p=0.048$). Furthermore, LOH was observed in a greater number of markers when compared with MSI. Thus, our results support that MSI is less common than LOH in ovarian cancers.

Key words: Genomic instability; MSI; LOH; ovarian cancer

INTRODUCTION

Ovarian cancer is currently the most lethal gynecological malignancy in women, in spite of the low prevalence. Because this cancer presents great difficulties for diagnosis, especially due to detection tardiness, it has a small chance of cure. Approximately 75% of ovarian cancers are diagnosed at advanced stages, being the overall patient survival usually <30% in these cases (Huan et al., 2008; Inca, 2012).

Ovarian cancer is the eighth most common women malignancy worldwide, affecting approximately 225,500 women and causing almost 140,200 cancer deaths per year (Jemal et al., 2011). This cancer is the fourth most frequent cause of cancer-related death in women in Europe and United States (Bandiera et al., 2012). In Brazil, 5,530 women were diagnosed with ovarian cancer in 2008 and 2,982 women died with the disease (Ferlay et al., 2010). According to data from the *Instituto Nacional de Câncer - INCA* (Brazilian National Cancer Institute) in 2012, 6,190 and 110 new cases of ovarian cancer are expected in Brazil and

Espírito Santo State, respectively (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2011).

The molecular pathogenesis of ovarian cancer is still poorly understood (Shen et al., 2006); however it is believed that microsatellite instability (MSI) and/or loss of heterozygosity (LOH) at different chromosomal locations are implicated in ovarian cancer development (Plisiecka-halasa et al., 2008).

MSI is defined as a size change in short tandem repeat sequences (STR), in the tumor when compared to the normal tissue from the same patient (Boland et al., 1998).

MSI was first described in colorectal cancers and it has since been shown to play a significant role in several other cancers. The association of MSI and cancer has resulted in many advances in the detection of cancer susceptibility, chemotherapy response and prognosis (Sood et al., 2001). MSI at numerous loci in multiple different cancers suggests that genetic instability is an important event in the progression of cancer (Galindo et al., 2011).

In ovarian tumors, the reported incidence of MSI ranges from 5 to 50%, depending on the markers used as well as the definition of MSI (Sood et al., 2001).

LOH results from the random loss of one allele by deletion or gene conversion, leading to a putative tumor growth advantage (Ando et al., 2000; Powierska-Czarny et al., 2003). LOH is of particular importance because it enables recessive variants (especially in tumor suppressor genes) to influence tumor phenotype. High LOH frequency regions are candidates for harboring tumor suppressor genes (Skirnisdottir et al., 2012).

In ovarian carcinoma, LOH is a common phenomenon, but there are regions with high LOH frequencies without candidate responsible genes (Plisiecka-halasa et al., 2008).

In the present study, we analyzed MSI and LOH in 24 ovarian carcinomas at twelve microsatellite loci to identify possible correlations between these events and histopathological tumor features.

MATERIAL AND METHODS

Ethics

This study was approved by the Research Ethics Committee of the *Universidade Federal do Espírito Santo* (protocol number CEP-002/09).

Sample collection and DNA preparation

Archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues from 24 ovarian cancer samples were obtained from the Department of Pathology of the *Santa Rita de Cássia Hospital*, Espírito Santo State, Brazil, during years 2009 and 2010. Tumor samples were collected by Pathologist guided 3mm punches of tumor blocks. Briefly, histology slides were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tissues, stained with hematoxylin/eosin and allowed to air dry. Tumor tissue was marked in hematoxylin/eosin stained slides by the Pathologist and aligned with the respective sample block, so that the punch could be taken. Normal tissue control was also obtained from each block.

DNA extraction

DNA was extracted from 0.5 mm punch slices, by incubating at 58°C for five days in 0.5M Tris, 0.02 M EDTA, 0.01 M NaCl, 1 mg/ml proteinase K and 2% SDS and subsequently submitted to an organic extraction with phenol-chloroform. Finally, samples were eluted in 100 µl of 3 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM EDTA-NaOH (pH 8.0).

Microsatellite analysis

Twelve markers (CYP19, CYP11, AR, D8S135, D10S197, UGT1A1, D2S119, D3S1611, ERα, ERβ, D5S346, D17S250) were used in this study for MSI and LOH analysis. PCR was performed in simplex reactions with a final volume of 15 µl, using cycling conditions specific to each primer pair. The PCR reaction was performed according to Taq Platinum[®] enzyme manufacturer's recommendations (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Amplified fragments were resolved in 15% polyacrylamide gels at 160 V for 15 hours and visualized after silver staining. MSI was detected when tumor alleles showed size contraction or expansion when compared to normal tissue alleles. LOH was defined as a visible reduction of 50% or more in the normal band intensity. LOH was only detectable when normal alleles were at heterozygosity. Positive cases were reamplified for result confirmation.

Statistical analysis

Statistical tests were performed using SPSS version 17.0 and EpiInfo version 3.5.1. Associations between MSI/LOH and tumor clinicopathological parameters were performed using Fisher's exact test and Odds Ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI). A significance value of $P < 0.05$ was used for all analyses.

RESULTS

DNA samples from twenty-four ovarian tumors and their adjacent normal tissue were analyzed using twelve STR markers. Patients presented a mean age of 55 years and a median of 54.5 years, ranging from 30 to 84 years (*Standard Deviation* = 13.8).

Tumor samples consisted of 7 serous cystadenocarcinoma (29.2%), 1 mucinous cystadenocarcinoma (4.2%), 7 other malignant tumors (29.2%), 5 metastatic ovarian tumors (20.8%) and 4 borderline tumors (16.6%).

Genomic instability analysis

Eleven of 24 ovarian tumors presented MSI or LOH. The highest MSI frequency was for marker D5S346, being 2.4% the average MSI frequency for all markers (0-13.6% range). CYP11 showed the highest LOH frequency, being 6.2% the average LOH frequency for all markers (0-15.4% range).

Considering positivity at only one locus, frequencies of 16.7% and 25% were found for MSI and LOH respectively (MSI: 4/24; CI: 1.78%-31.62%; LOH: 6/24; CI: 7.68%-42.32%).

Considering positivity at two loci, frequencies of MSI and LOH were both, 4.17% (1/24; CI: 0.00%-11.97%). At three or more loci, MSI frequency dropped to 0% (0/24), whereas LOH frequency was 4.17% (1/24; CI: 0.00%-11.97%).

Genomic instability characteristics, number of heterozygous and the total number of samples analyzed for each marker are described in Table 1. Genomic instability results by case are presented in Table 2.

Correlation between MSI/LOH and clinicopathological parameters

We did not observe statistically significant correlations between MSI/LOH and age at diagnosis. However, a significant correlation was observed between D17S250 LOH and

mucinous cystadenocarcinoma ($p=0.0003$). Furthermore, a combined analysis of LOH and MSI in ER α shows an association with serous and mucinous cystadenocarcinomas ($p=0.048$).

Marker combination analysis

In order to increase the efficiency of individual marker analysis, we examined markers in combinations and their possible correlation with ovarian cancer characteristics. Markers were selected according to their genomic instability frequencies. Marker groups were AR/ER α , D5S346/D17S250 and AR/ER α /D5S346/D17S250, but we did not find significant associations between marker group genomic instability and age at diagnosis or histological type ($p>0.05$).

DISCUSSION

Ovarian cancer is a heterogeneous and cytogenetically complex disease (Helleman et al., 2006; Skirnisdottir et al., 2012), exhibiting extensive molecular heterogeneity and several genetic alterations (Darcy and Birrer, 2010), such as microsatellite instability and loss of heterozygosity, which could be related to cancer development (Plisiecka-Hałasa et al., 2008). We have analyzed 24 ovarian tumor samples, using 12 microsatellites markers. Six MSI cases were detected in ER α , D5S346 and D17S250 markers.

Our results showed only MSI-L, defined as instability at $<30-40\%$ of loci when more than five markers are used (Kuligina et al., 2007), suggesting that this type of MSI is an event more frequent than MSI-H (instability at $\geq 30-40\%$ of loci) (Kuligina et al., 2007), in ovarian cancer. In accord with our results, Sood et al, in a study using 109 ovarian tumors, also showed that MSI-L is an event more frequent than MSI-H in ovarian cancer (Sood et al., 2001).

In agreement with previous reports, LOH was more frequent than MSI in ovarian cancer (Allen et al., 2000; Bozzetti et al., 2004; Plisiecka-Hałasa et al., 2008), being detected in seven markers (AR, CYP11, D10S197, D3S1611, ER α , D5S346, D17S250) and in eight ovarian cancer cases (33.3%), however, some samples showed LOH in more than one locus simultaneously.

D17S250 LOH was correlated with tumor histological type. This marker is used in HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer Syndrome), which is associated with ovarian cancer. HNPCC syndrome is the third leading cause of hereditary ovarian cancer (Pal et al., 2008) and, approximately, 10 to 15% of hereditary ovarian cancers are found in patients with this syndrome (Aysal et al., 2012). However, D17S250 is centromeric to the BRCA1 gene, which is a tumor suppressor gene, therefore it is possible that BRCA1 and/or other genes on chromosome 17q could be involved in ovarian cancer carcinogenesis. LOH on chromosome 17q has been previously associated with the development of ovarian cancer in elderly patients, especially high-grade serous or mixed endometrioid-serous carcinomas (Garcia et al., 2000).

In conclusion, we observed that MSI and LOH frequencies varied among markers, nevertheless LOH was observed in a greater number of markers if compared with MSI. Our data support that LOH is a more frequent event than MSI in ovarian cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

Part of this study was sponsored by Fibria Celulose. L.N.R.A. was supported by a CNPq scholarship. E.V.W. was supported by a FAPES Ph.D. scholarship.

REFERENCES

- Allen HJ, DiCioccio RA, Hohmann P, Piver MS, et al. (2000). Microsatellite instability in ovarian and other pelvic carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 117:163-166.
- Ando Y, Iwase H, Ichihara S, Toyoshima S, et al. (2000). Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Lett.* 156: 207-214.
- Aysal A, Karnezis A, Medhi I, Grenert JP, et al. (2012). Ovarian endometrioid adenocarcinoma: incidence and clinical significance of the morphologic and immunohistochemical markers of mismatch repair protein defects and tumor microsatellite instability. *Am J Surg Pathol.* 36: 163-172.
- Bandiera E, Franceschini R, Specchia C, Bignotti E, et al. (2012). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor serum determination in women with ovarian cancer. *ISRN Obstet Gynecol.* 2012: 245756.

- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, et al. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 5248-5257.
- Bozzetti C, Bortesi B and Merisio C. (2004). Loss of heterozygosity (LOH) in ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 85: 294-295.
- Darcy KM and Birrer MJ. (2010). Translational research in the Gynecologic Oncology Group: evaluation of ovarian cancer markers, profiles, and novel therapies. *Gynecol Oncol.* 117: 429-439.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, et al. (2010). GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available at [<http://globocan.iarc.fr>]. Accessed October 01, 2012.
- Galindo CL, McIver LJ, Tae H, McCormick JF, et al. (2011). Sporadic breast cancer patients' germline DNA exhibit an AT-rich microsatellite signature. *Genes Chromosomes Cancer.* 50: 275-283.
- Garcia A, Bussaglia E, Machin P, Matias-Guiu X, et al. (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 17q in epithelial ovarian tumors: association with carcinomas with serous differentiation. *Int J Gynecol Pathol.* 19: 152-157.
- Helleman J, van Staveren IL, Dinjens WN, van Kuijk PF, et al. (2006). Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer.* 6: 201.
- Huan Z, Nakayama K, Nakayama N, Ishibashi M, et al. (2008). Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival. *Oncol Rep.* 19: 775-781.
- Inca: Instituto Nacional de Câncer. Available at [<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>]. Accessed October 01, 2012.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. (2011). Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Inca, Rio de Janeiro.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, et al. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61: 69-90.

- Kuligina ESh, Grigoriev MY, Suspitsin EN, Buslov KG, et al. (2007). Microsatellite instability analysis of bilateral breast tumors suggests treatment-related origin of some contralateral malignancies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 133: 57-64.
- Pal T, Permuth-Wey J and Sellers TA. (2008). A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. *Cancer*. 113: 733-742.
- Plisiecka-Hałasa J, Dansonka-Mieszkowska A, Kraszewska E, Dańska-Bidzińska A, et al. (2008). Loss of heterozygosity, microsatellite instability and TP53 gene status in ovarian carcinomas. *Anticancer Res*. 28:989-996.
- Powierska-Czarny J, Miścicka-Sliwka D, Czarny J, Grzybowski T, et al. (2003). Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer with the use of a well characterized multiplex system. *Acta Biochim Pol*. 50: 1195-1203.
- Shen XJ, Ali-Fehmi R, Weng CR, Sarkar FH, et al. (2006). Loss of heterozygosity and microsatellite instability at the Xq28 and the A/G heterozygosity of the QM gene are associated with ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*. 5: 523-528.
- Skirnisdottir I, Mayrhofer M, Rydåker M, Akerud H, et al. (2012). Loss-of-heterozygosity on chromosome 19q in early-stage serous ovarian cancer is associated with recurrent disease. *BMC Cancer*. 12: 407.
- Sood AK, Holmes R, Hendrix MJ and Buller RE. (2001). Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. *Cancer Res*. 61: 4371-4374.

Tables

Table 1. LOH and MSI in ovarian cancer

Markers	MSI		LOH		Heterozygous		Total	
	N	<i>f</i>	N	<i>f</i>	N	<i>f</i>	N	(%)
CYP19	0	0.000	0	0.000	16	0.800	20	0.833
CYP11	0	0.000	2	0.154	13	0.684	19	0.792
AR	0	0.000	3	0.136	22	1.0	22	0.917
D8S135	0	0.000	0	0.000	5	0.208	24	1.0
D10S197	0	0.000	1	0.056	18	0.818	22	0.917
UGT1A1	0	0.000	0	0.000	9	0.409	22	0.917
D2S119	0	0.000	0	0.000	10	0.500	20	0.833
D3S1611	0	0.000	1	0.056	18	0.783	23	0.958
ER α	1	0.056	1	0.143	7	0.389	18	0.750
ER β	0	0.000	0	0.000	12	0.750	16	0.667
D5S346	3	0.136	3	0.150	20	0.909	22	0.917
D17S250	2	0.095	1	0.048	21	1.0	21	0.875

Table 2. LOH and MSI distribution in ovarian cancer cases, individually.

Tumor	AR	CYP11	CYP19	D8S135	D10S197	UGT1A1	D2S119	D3S1611	ER α	ER β	D5S346	D17S250
1									●		○	
2		○								x		
3												
4								○			○	
5		x	x				x		x	x		
6		○							x	x		
7	○								○		○	○
8										x		
9	○										●	●
10		x	x				x		x	x	x	x
11												
12											●	
13	x	x	x		x	x	x		x	x		x
14												
15												
16												
17	○											
18												
19												
20												●
21												
22					○							
23		x							x	x	●	
24	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x

○ = LOH; ● = MSI; x = non informative case

Comprovação de aceite do manuscrito 3

Prezado Autor,

GMR 2611 – “Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in ovarian cancer: a study in the population of Espírito Santo, Brazil.”

Como parte da nova política da Genetics and Molecular Research (GMR), solicitamos o pagamento da taxa de publicação para que possamos avançar mais uma etapa no processo do artigo de vossa autoria, aceito por nosso conselho editorial.

O pagamento da taxa de publicação (R\$1.380,00) deve ser realizado para que o artigo possa ser analisado e revisado por nosso conselho editorial técnico.

O processo de análise da redação científica e revisão do inglês faz parte da política editorial da GMR. Muitos artigos submetidos à publicação com certificado de revisão de agências especializadas são rejeitados pela fraca qualidade do inglês. Assim, a GMR tem trabalhado intensamente para manter sua alta qualidade.

Ratificamos que a revista não recebe auxílio de qualquer natureza de órgãos públicos ou privados, por isso, solicitamos aos autores que colaborem conosco e com a manutenção da GMR.

Concluindo: para que possamos dar continuidade ao processo do artigo, pedimos que verifique o arquivo anexado com instruções de pagamento da taxa de publicação.

Contando com sua compreensão.

Atenciosamente,

--

Francine Muniz

Editorial coordinato

www.geneticsmr.com

MSN: gmr@geneticsmr.com

Enjoy our page on Facebook

Add us on LinkedIn

5.4 MANUSCRITO 4

Manuscrito intitulado “*Steroid metabolism gene polymorphisms and their implications on breast and ovarian cancer prognosis*”, formatado e submetido à revista *Molecular and Cellular Biochemistry*, como pode ser observado pela capa do formulário de submissão que se encontra no final deste manuscrito.

Title Page

Authors

Eldamária de Vargas Wolfgramm¹, Lyvia Neves Rebello Alves¹, Marcelo dos Santos¹, Flávia de Paula¹, Iúri Drumond Louro^{1*}

Title

Steroid metabolism gene polymorphisms and their implications on breast and ovarian cancer prognosis

The affiliations and addresses of the authors

¹Núcleo de Genética Humana e Molecular
Departamento de Ciências Biológicas
Centro de Ciências Humanas e Naturais
Universidade Federal do Espírito Santo
Av. Marechal Campos, 1468 - Campus de Maruípe
29040-090 - Vitória - ES - Brazil
Phone: +55-27-3335.7493; Fax: +55-27-3335.7250

*Corresponding author:

E-mail address: iurilouro@yahoo.com

Tel.: +55-27-3335.7493; Fax: +55-27-3335.7250.

Abstract

A role for estrogen in the etiology of breast and ovarian cancers has been suggested, therefore, genetic polymorphisms in steroid metabolism genes could be involved in the carcinogenesis of these tumors. We have aimed to investigate the role of GSTP1 and CYP17 polymorphisms and their correlation with MSI (microsatellite instability) and LOH (loss of heterozygosity) in AR, ER β and CYP19 genes in women from Espirito Santo State, Brazil. GSTP1 and CYP17 polymorphisms alone were not associated with an increased risk for breast or ovarian tumors. However, when combined with MSI/LOH in AR, ER β and CYP19 genes, we were able to detect significant associations with the GSTP1 wild-type genotype in PR (progesterone receptor) negative breast cancers or the CYP17 wild-type genotype in ER (estrogen receptor) and PR-negative breast tumors. No associations with ovarian tumors were detected. Our results suggest that wild-type GSTP1 or CYP17 genes when combined with LOH/MSI in steroid metabolism genes may play a role in ER and/or PR negative breast cancers. These data support the hypothesis that genes related to steroid metabolism are important in the characterization of breast cancer and that the analysis of single polymorphisms may not be sufficient.

Keywords: breast and ovarian cancer; GSTP1; CYP17; STR markers; polymorphisms.

Text

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy among females and the most common cause of cancer death among women in Western countries [1, 2] and ovarian cancer is the most lethal gynecological malignancy at present [3, 4].

Germline mutations in the so-called high penetrance genes of breast and ovarian cancer predisposition, such as BRCA1 and BRCA2, appear to account for the majority of hereditary breast and ovarian cancers, but they represent only 5% to 10% of breast cancer cases and up to 15% of ovarian cancers [5, 6].

Thus, polymorphisms in low penetrance susceptibility genes can be linked with a significant percentage of breast and ovarian cancers. Low penetrance susceptibility genes can be involved in a

wide variety of functions including steroid hormone metabolism, detoxification of environmental carcinogens, DNA damage repair genes and tumor suppressor genes [5, 7, 8].

Polymorphisms in the cytochrome P450 family (CYPs) and in the glutathione S-transferase (GSTs) enzymes have been of particular interest because these enzymes play an important role in the metabolism of environmental carcinogens and of estrogen [2, 9], which seems to be involved in breast and ovarian carcinogenesis. Genes of these families are highly polymorphic, presenting alleles with different enzymatic activities and possibly tumor risk [9].

The CYP17 gene encodes the cytochrome P450c17 α enzyme, which is a key enzyme in the estradiol synthesis [10], converting pregnenolone and progesterone to androgen and estrogen precursors [9].

The T→C polymorphism in the 5'-untranslated promoter region creates an additional SpI-type promoter site 34 bp upstream of the translation initiation site, which has been shown to be associated with CYP17 expression levels and thus estrogen levels [11].

Some groups have reported an association of the A2 allele (variant allele C) with increased breast cancer risk because patients with the A2 allele had higher levels of circulating estrogens than those with A1 alleles [9, 11], but other studies have failed to replicate these findings [9].

In ovarian cancer, presence of the A2 variant has been associated with increased disease risk.

Furthermore, the A2 allele has also been associated with polycystic ovarian syndrome, a condition resulting from high androgen levels [12].

GST enzymes have the capacity to detoxify reactive PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) metabolites, preventing them from becoming carcinogens. These enzymes are involved in DNA protection from oxidative damage, including free radicals and metabolites generated through estrogen metabolism [9].

Single nucleotide substitutions in GSTP1 exon 5 (A313G; Ile105Val) are in close proximity with the substrate binding site of GSTP1 and the Val variant has been demonstrated to have either lower or higher specific activity and affinity than the Ile variant, depending on the substrate [5].

Previous studies on the potential association of GSTP1 polymorphisms and breast cancer have produced inconsistent results [2, 9] and few studies have investigated the association of this polymorphism with ovarian cancer.

Moreover, polymorphisms in short tandem repeat regions (STR), also known as microsatellites markers, have been extensively studied in tumors [13]. These polymorphisms can occur due to expansion or contraction of repeat sequences giving rise to what is referred to as MSI [13, 14]. MSI occurs in about 90% of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and has also been observed in a variety of sporadic cancers, including colon, endometrium, pancreas and bladder [14]. In breast cancer, there is no consensus regarding the frequency of MSI. Some studies have found that MSI is not associated with this neoplasm, while others have reported frequencies that vary from 5% to 40 % [15]. In ovarian cancer, MSI frequency ranges from 5% to 50% [16], being the higher frequencies observed in endometrioid, mucinous and clear cell ovarian tumors [17]. Analysis of the highly polymorphic microsatellite loci not only provides information about MSI, but also allows for the detection of LOH in tumor cells [18].

LOH is thought to indicate regions harboring tumor suppressor genes and this phenomenon may also reflect random chromosomal instability, thus a high frequency of LOH may indicate DNA damage or instability [19].

In breast and ovarian cancer, frequent LOH has been detected on chromosomes 3p, 6q, 11p, 13q, 16q, 17p, 17q and 18q, so that several tumor suppressor genes have been mapped to these regions [17, 20]. Our group has previously shown that CYP19, AR and ER- β markers combinatorial analysis demonstrated that MSI/LOH was related with histological grade III, ER-negative and PR-negative cases in breast cancer samples in Espírito Santo (Brazil), suggesting their use as markers of worse prognosis [21].

For all these reasons, our aim was to analyze the influence of GSTP1 and CYP17 polymorphisms in breast and ovarian cancer cases in Espírito Santo, Brazil, and their correlation with MSI/LOH in AR, ER β and CYP19 genes, which are all involved in steroid metabolism .

Material and Methods

Ethics

This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Espírito Santo, protocol number 02/09, including the informed consent waiver for breast and ovarian cancer cases and

was performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. The control group volunteers signed a written informed consent.

Sample

The study population consisted of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues from 107 female breast and 24 ovarian tumors, obtained from Santa Rita de Cássia Hospital Pathology Department, Espírito Santo State, Brazil, during years 2009 and 2010. Tumor cells were collected by a 3mm punch in the tumor block, guided by the Pathologist. Briefly, histological slides were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tissues, stained with hematoxylin & eosin and allowed to air dry. Tumor tissue was marked in the hematoxylin-eosin stained slides by a Pathologist and slides were aligned with the block for punch extraction. Normal control tissue was obtained from the same block. General population GSTP1 and CYP17 gene polymorphism frequencies were studied from 61 healthy female blood donors at the Espírito Santo Hemotherapy and Hematology Center with no previous personal or familial history of breast and ovarian cancer.

DNA extraction

Breast and ovarian cancer genomic DNA was extracted from the punch fragment by slicing and incubating at 58°C for five days in 0.5 M Tris, 0.02 M EDTA, 0.01 M NaCl, 1 mg/ml proteinase K and 2% SDS solution. Lysates were subsequently submitted to organic extraction with phenol-chloroform. Healthy control DNA was isolated from peripheral blood using a phenol-chloroform organic extraction.

Genotyping analysis

GSTP1 Ile-Val polymorphism was determined by PCR-RFLP [22]. PCR products were digested with 1 U BsmA1 restriction enzyme for 16 h at 55°C and visualized in silver stained 10% polyacrylamide gels. The wild-type allele was identified by the presence of a 176 bp size fragment. Variant alleles are restricted and yield two fragments of 91 and 85 bp. The presence of three fragments (176, 91 and 85 bp) indicates heterozygosity. CYP17 genotypes were also determined by PCR-RFLP [23]. PCR

product digestion was carried for 16 h at 37°C with 1 U of MspAII restriction enzyme and products were visualized in silver stained 7% polyacrylamide gels. The wild-type allele was identified by a 414 bp size fragment. Variant alleles produce two fragments of 290 and 124 bp. The presence of three fragments (414, 290 and 124 bp) indicates heterozigosity. Microsatellite markers were analyzed as previously published [21].

Statistical analysis

GSTP1 and CYP17 polymorphism frequencies were analyzed using contingency tables to calculate odds ratio (OR) with a confidence interval (CI) of 95%. A Fisher's exact test significance value of $p < 0.05$ was considered, using EpiInfo version 3.5.1 software. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was estimated using the Arlequin software, version 3.11 [24]. Quantitative variables (mean age, median and standard deviation (SD)) were analyzed by SPSS version 17.0.

Results

Histopathological characteristics of breast and ovarian tumors are summarized in Table 1. Mean and median ages for breast cancer were, respectively, 55.91 and 56.00 years (SD=13.1; range 28 to 89 years); as for ovarian cancer, they were 55 and 54.5 years, respectively (SD=13.8; range 30 to 84 years), whereas for healthy female controls, mean age was 31.8 and median age was 28 years (SD=10.8; range 18 to 56).

Regarding ethnicity, breast cancer patients were considered 22.4% (24/107) caucasoids and 56.1% (60/107) mulattos, reflecting the mixed ethnicity present in this state [25]. For ovarian tumor patients and healthy controls, this information was not possible to collect.

GSTP1 and CYP17 genotypic and allelic distribution in breast/ovarian cases and controls are summarized in Table 2. We did not find any significant increase of breast and ovarian cancer risk associated with genotypes and/or alleles of these genes.

Healthy control genotypic frequencies were in HWE. Associations between breast and ovarian cancer clinicopathological characteristics with GSTP1 and CYP17 genotypic frequencies are shown in Table 3 and 4. We found a significant statistical association between the CYP17 A2/A2 genotype and PR-

positive breast cancer ($p=0.049$). Histological type and grade, ER and HER2 status and age at diagnosis of breast cancer did not show significant correlations with genotypes. The CYP17 A2/A2 genotype was significantly more present in the ovarian cancer age group ≤ 50 years ($p=0.027$). To further investigate if GSTP1 and CYP17 might be related with breast and ovarian cancer, we analyzed their association with polymorphisms in steroid metabolism genes AR, ER β and CYP19. Initially, we analyzed the combination of GSTP1 with MSI/LOH in each gene individually. Later on, we performed a combinatorial analysis of GSTP1 genotypes with MSI/LOH in AR+ER β , AR+CYP19 or ER β +CYP19. Finally, we analyzed the association of GSTP1 genotypes with MSI/LOH in AR+ER β +CYP19 all together. The same analyses were performed for CYP17. Associations of GSTP1 genotypes and MSI/LOH are shown in Tables 5 and 6. The Ile/Val genotype showed a correlation with ER β MSI/LOH in ER-negative breast cancers ($p=0.028$), as well as the Ile/Ile genotype with AR+CYP19 ($p=0.021$) and AR+ER β +CYP19 ($p=0.036$) MSI/LOH in PR-negative breast cancers. CYP17 A1/A1 genotype was associated with AR+ER β and AR+ER β +CYP19 MSI/LOH in ER or PR-negative breast tumors ($p=0.039$). No associations were detected for ovarian tumors (data not showed).

Discussion

There is substantial evidence that steroid hormones play an important role in the etiology of breast and ovarian cancer [4, 26]. Therefore, there has been recent interest in steroid metabolism genes, because the activity these gene products may affect long-term estrogen levels and its potentially carcinogenic metabolites, influencing breast and ovarian cancer risk [27].

In most studies, estrogen biosynthesis and metabolism gene polymorphisms are considered separately [5], finding a small effect of low penetrance susceptibility breast and ovarian cancer risk gene polymorphisms [11]. In our study, we have analyzed SNPs (Single-Nucleotide Polymorphism) in two low penetrance susceptibility genes and their association with MSI/LOH in steroid metabolism genes. Specific associations between gene polymorphisms and MSI/LOH could result in high-risk profiles, by influencing lifetime estrogen levels and therefore breast and ovarian cancer risk [5].

We performed a case-control study of Brazilian women to investigate the association of GSTP1 and CYP17 gene polymorphisms with breast and ovarian cancer, as well as with MSI/LOH in three genes

implicated in steroid metabolism (AR, ER β and CYP19). When tested alone, the GSTP1 gene showed no significant association with breast and ovarian cancer risk. Most previous studies on the potential association of GSTP1 polymorphisms and breast and ovarian cancer risk produced inconsistent results. Delort et al (2008) [8], Ramalhinho et al (2011) [28] and Spurdle et al (2001) [29] showed results similar to ours, whereas an association between GSTP1 genotypes and breast cancer risk was observed by Torresan et al (2008) [9] in Euro-descendent women from Southern Brazil and by Antognelli et al (2009) [2], which found that the frequency of the Val allele was significantly lower in the breast cancer population. Inconsistencies may be partly due to differences in populations and their exposures to different environmental risk factors [9].

A combinatorial analysis of GSTP1 genotypes and MSI/LOH in AR, ER β or CYP19 enabled us to detect that the Ile/Ile genotype is related to MSI/LOH in AR+CYP19 or AR+ER β +CYP19 in PR-negative breast tumors (Table 6), suggesting that this genotype when combined with MSI/LOH may be associated with poor prognosis of breast cancer.

According to Ramalhinho et (2011) [28], the GSTP1 Ile/Ile genotype increases breast cancer risk when associated with GSTM1/GSTT1 null genotypes, suggesting that the Val allele tends to act as a protective, rather than a risk factor.

Regarding CYP17 polymorphism distribution in breast and ovarian tumors, there are also controversial evidences. Early reports suggested an association of CYP17 A2 with an increased breast cancer risk; however, subsequent studies failed to confirm this association [7, 27]. As for ovarian cancer risk, Spurdle et al (2001) [29] and Goodman et al (2001) [12] reported no evidence for an association between CYP17 polymorphisms and ovarian cancer risk, while Garner et al (2002) [27] noted an increased risk for ovarian cancer in A2 variant women >50 years.

Our results did not show a significant association between CYP17 polymorphisms and breast and ovarian cancer risk. However, when we analyzed the relation between CYP17 genotypes and histopathological characteristics of breast tumors, a statistically significant frequency of the A2/A2 genotype in patients with PR-positive breast cancers was found (Table 3). For ovarian cancer, a significant frequency of the A2/A2 genotype was observed in the age at diagnostic group ≤ 50 years (Table 4).

Because the A2 variant allele creates an additional putative Sp-1 binding site (CCACC) in the CYP17 promoter region, it is speculated that the C allele enhances gene transcription, leading to increased estrogen synthesis in breast and ovarian tumors [11, 27].

A combinatorial analysis of CYP17 genotypes with MSI/LOH in AR, ER β or CYP19 genes allowed for the detection of a correlation between the A1/A1 genotype and a higher frequency of MSI/LOH in AR+ER β or AR+ER β +CYP19 in ER-negative and PR-negative tumors (Table 6). Similarly, the CYP17 wild-type genotype when combined with MSI/LOH was associated with poor prognosis of breast cancer.

AR, ER β and CYP19 genes participate in the androgen hormone pathway. The androgen receptor (AR) has a polymorphic polyglutamine repeat (CAG repeat) in the amino-terminal domain while the ER β gene contains a polymorphic dinucleotide CA repeat in the non-coding 3'-portion of the gene. Polymorphic repeats appear to influence function and alter androgen serum levels in premenopausal women [30], because sex hormone receptors (AR and ER β) mediate hormone response at breast tissue level, having a possible pathological role in breast cancer development [31]. CYP19 (aromatase) is involved in the last stage of androgen to estrogen conversion (androstenedione into estrone and testosterone into estradiol) [7, 11] and its activity helps determines local estrogen levels. A tetranucleotide (TTTA) tandem repeat polymorphism is located in intron 4 next to an intron/exon junction what suggests a possible role for this polymorphism in the translated enzyme due to an alteration on the splice site [5].

To our knowledge, this is the first study to analyze the potential role of GSTP1 and CYP17 genotypes in combination with AR, ER β and CYP19 MSI/LOH in Brazilian women with breast or ovarian tumors. We observed that wild-type GSTP1 and CYP17 genotypes when combined with MSI/LOH in steroid metabolism genes are associated with ER-negative or PR-negative breast cancers. These results support the hypothesis that estrogen metabolism genes can be helpful in the characterization of breast cancer prognosis [5].

Acknowledgments

Part of this study was sponsored by Fibria Celulose. E.V.Wolfgramm was supported by a CNPq doctorate scholarship. L.N.R.Alves was supported by a CNPq scholarship.

Conflict of interest: none.

References

- [1] Imyanitov EM, Hanson KP (2004) Mechanisms of breast cancer. *Drug Discov Today: Dis Mechanisms* 1:235-245.
- [2] Antognelli C, Del Buono C, Ludovini V, Gori S, Talesa VN, Crinò L, Barberini F, Rulli A (2009) CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study. *BMC cancer*. doi:10.1186/1471-2407-9-115.
- [3] Huan Z, Nakayama K, Nakayama N, Ishibashi M, Yeasmin S, Katagiri A, Purwana IN, Iida K, Maruyama R, Fukumoto M, Miyazaki K (2008) Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival. *Oncol Rep* 19:775-781.
- [4] Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, McDuffie KE, Carney ME, Terada KY, Goodman MT (2009) Genetic polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene and the risk of epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Causes Control* 20:47-55.
- [5] Ramalhinho AC, Fonseca-Moutinho JA, Breitenfeld Granadeiro LA (2012) Positive association of polymorphisms in estrogen biosynthesis gene, CYP19A1, and metabolism, GST, in breast cancer susceptibility. *DNA Cell Biol* 31:1100-1106.
- [6] Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, Bewtra C, Lynch JF, Butts M, Godwin AK (2009) Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol* 3:97-137.
- [7] Miyoshi Y, Noguchi S (2003) Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing genes and breast cancer risk in Japanese women. *Biomed Pharmacother* 57:471-481.
- [8] Delort L, Chalabi N, Satih S, Rabiau N, Kwiatkowski F, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ (2008) Association between genetic polymorphisms and ovarian cancer risk. *Anticancer Res* 28:3079-3081.

- [9] Torresan C, Oliveira MM, Torrezan GT, de Oliveira SF, Abuázar CS, Losi-Guembarovski R, Lima RS, Urban CA, Cavalli IJ, Ribeiro EM (2008) Genetic polymorphisms in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. *Clin Exp Med* 8:65-71.
- [10] Kristensen VN, Borresen-Dale AL (2000) Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutat Res* 462:323-33.
- [11] Zhang L, Gu L, Qian B, Hao X, Zhang W, Wei Q, Chen K (2009) Association of genetic polymorphisms of ER-alpha and the estradiol-synthesizing enzyme genes CYP17 and CYP19 with breast cancer risk in Chinese women. *Breast Cancer Res Treat* 114:327-338.
- [12] Goodman MT, McDuffie K, Guo C, Terada K, Donlon TA (2001) CYP17 Genotype and Ovarian Cancer: A Null Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:563-564.
- [13] Zhang W, Yu YY (2007) Polymorphisms of short tandem repeat of genes and breast cancer susceptibility. *Eur J Surg Oncol* 33:529-534.
- [14] Yoon BS, Kim YT, Kim JH, Kim SW, Nam EJ, Cho NH, Kim JW, Kim S (2008) Clinical significance of microsatellite instability in sporadic epithelial ovarian tumors. *Yonsei Med J* 49:272-278.
- [15] Shen KL, Yang LS, Hsieh HF, Chen CJ, Yu JC, Tsai NM, Harn HJ (2000) Microsatellite alterations on human chromosome 11 in in situ and invasive breast cancer: a microdissection microsatellite analysis and correlation with p53, ER (estrogen receptor), and PR (progesterone receptor) protein immunoreactivity. *J Surg Oncol* 74:100-107.
- [16] Sood AK, Holmes R, Hendrix MJ and Buller RE (2001) Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. *Cancer Res* 6:4371-4374.
- [17] Plisiecka-Hałasa J, Dansonka-Mieszkowska A, Kraszewska E, Dańska-Bidzińska A, Kupryjańczyk J (2008) Loss of heterozygosity, microsatellite instability and TP53 gene status in ovarian carcinomas. *Anticancer Res* 28:989-996.
- [18] Powierska-Czarny J, Miścicka-Sliwka D, Czarny J, Grzybowski T, Wozniak M, Drewa G, Czechowicz W, Sir J (2003) Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer with the use of a well characterized multiplex system. *Acta Biochim Pol* 50:1195-1203.

- [19] Tokunaga E, Okada S, Yamashita N, Akiyoshi S, Kitao H, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y (2010) High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers. *Breast Cancer* 19:161-169.
- [20] Ando Y, Iwase H, Ichihara S, Toyoshima S, Nakamura T, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Karamatsu S, Mitsuyama S, Fujii Y, Kobayashi S (2000) Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Lett* 156:207-214.
- [21] De Vargas Wolfgramm E, Alves LN, Stur E, Tovar TT, De Nadai Sartori MP, de Castro Neto AK, Louro ID (2012) Analysis of genome instability in breast cancer. *Mol Biol Rep*. doi: 10.1007/s11033-012-2272-x.
- [22] Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR (1997) Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinog* 18:641-644.
- [23] McKean-Cowdin R, Feigelson HS, Pike MC, Coetzee GA, Kolonel LN, Henderson BE (2001) Risk of endometrial cancer and estrogen replacement therapy history by CYP17 genotype. *Cancer Res* 61:848-849.
- [24] Excoffier, Laval LG, Schneider S (2005) Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50.
- [25] Perrone A, Moreira THL (2003) História e Geografia do Espírito Santo. Gráfica Sodré, Vitória.
- [26] Dumas I, Diorio C (2011) Estrogen pathway polymorphisms and mammographic density. *Anticancer research* 31:4369-4386.
- [27] Garner EI, Stokes EE, Berkowitz RS, Mok SC, Cramer DW (2002) Polymorphisms of the estrogen-metabolizing genes CYP17 and catechol-O-methyltransferase and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 62:3058-3062.
- [28] Ramalhinho AC, Fonseca-Moutinho JA, Breitenfeld L (2011) Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population. *Mol Cell Biochem* 355:265-271.

- [29] Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G (2001) Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinog* 22:67-72.
- [30] Westberg L, Baghaei F, Rosmond R, Hellstrand M, Landén M, Jansson M, Holm G, Björntorp P, Eriksson E (2001) Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2562-2568.
- [31] Anghel A, Raica M, Marian C, Ursoniu S, Mitrasca O (2006) Combined profile of the tandem repeats CAG, TA and CA of the androgen and estrogen receptor genes in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 132:727-733.

Tables

Table 1: Clinical and histopathological features of breast and ovarian cancers.

Breast cancer	Characteristics	Total	
		N	(%)
	Histological type		
	Infiltrating ductal carcinoma	93	(86.9)
	Other carcinomas	14	(13.1)
	Histological grade^a		
	Grade I	5	(5.4)
	Grade II	57	(61.3)
	Grade III	31	(33.3)
	ER status^a		
	Negative	16	(17.2)
	Positive	77	(82.8)
	PR status^a		
	Negative	25	(26.9)
	Positive	65	(69.9)
	Missing	3	(3.2)
	HER2 status^a		
	Negative	88	(94.6)
	Positive	5	(5.4)
	Ki67 status^a		
	Negative	0	(0.0)
	Positive	91	(97.8)
	Missing	2	(2.2)
	Age at diagnosis		

	≤ 45 years	22	(20.6)
	≥ 46 years	85	(79.4)
<hr/>			
Ovarian	Histological type		
cancer			
	Serous cystadenocarcinoma	7	(29.2)
	Mucinous	1	(4.2)
	cystadenocarcinoma		
	Other malignant	7	(29.2)
	Metastatic tumor	5	(20.8)
	Borderline tumor	4	(16.7)
	Age at diagnosis		
	≤ 50 years	9	(37.5)
	≥ 51 years	15	(62.5)

^a infiltrating ductal carcinomas only.

Table 2: GSTP1 and CYP17 genotypic and allelic frequencies.

	Controls		Breast Cancer		Ovarian Cancer			
GSTP1								
Genotype	N=59	% (95% CI)	N=106	% (95% CI)	OR (95% CI)	N=21	% (95% CI)	OR (95% CI)
Ile/Ile	19	32.2 (20.3-44.1)	45	42.5 (33.1-51.9)	1.0	10	47.6 (26.3-69.0)	1.0
Ile/Val	29	49.2 (36.4-61.9)	49	46.2 (36.7-55.7)	0.71 (0.33-1.53)	9	42.9 (21.6-64.1)	0.59 (0.18-1.95)
Val/Val	11	18.6 (8.7-28.6)	12	11.3 (5.3-17.3)	0.46 (0.15-1.36)	2	9.5 (0.0-22.1)	0.35 (0.04-2.22)
Ile/Val+Val/Val	40	67.8 (55.9-79.7)	61	57.5 (48.1-66.9)	0.64 (0.31-1.32)	11	52.4 (31.0-73.8)	0.52 (0.17-1.62)
Allele	N=118		N=212			N=42		
Ile	67	56.8 (47.8-65.7)	139	65.6 (59.2-72.0)	1.0	29	69.0 (55.1-83.0)	1.0
Val	51	43.2 (34.3-52.2)	73	34.4 (28.0-40.8)	0.69 (0.42-1.12)	13	31.0 (17.0-44.9)	0.59 (0.26-1.32)
CYP17								
Genotype	N=61		N=69			N=12		
A1/A1	21	34.4 (22.5-46.3)	26	37.7 (26.3-49.1)	1.0	4	33.3 (6.6-60.0)	1.0
A1/A2	31	50.8 (38.3-63.3)	36	52.2 (40.4-64.0)	0.94 (0.41-2.12)	5	41.7 (13.8-69.6)	0.85 (0.17-4.35)
A2/A2	9	14.8 (5.8-23.6)	7	10.1 (3.0-17.2)	0.63 (0.17-2.26)	3	25.0 (0.5-49.5)	1.75 (0.24-12.46)
A1/A2 + A2/A2	40	65.6	43	62.3	0.87	8	66.7	1.05

		(53.7-77.5)		(50.9-73.7)	(0.40-1.89)		(40.0-93.4)	(0.24-4.76)
Allele	N=122		N=138			N=24		
A1	73	59.8	88	63.8	1.0	13	54.2	1.0
		(51.1-68.5)		(55.8-71.8)			(34.3-74.1)	
A2	49	40.2	50	36.2	0.85	11	45.8	1.26
		(31.5-48.9)		(28.2-44.2)	(0.50-1.44)		(25.9-65.7)	(0.48-3.31)

Table 3: GSTP1 and CYP17 genotype distribution according to breast tumor features.

	GSTP1				CYP17			
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	P	A1/A1	A1/A2	A2/A2	P
Histological type	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	N (%)	
IDC ^a	35 (38.0)	46 (50.0)	11 (12.0)	0.061	22 (36.7)	31 (51.7)	7 (11.7)	0.549
Other carcinomas	10 (71.5)	3 (21.5)	1 (7.0)		4 (44.4)	5 (55.6)	0 (0.0)	
Grade								
I	3 (60.0)	3 (20.0)	1 (20.0)	0.517	1 (33.0)	2 (67.0)	0 (0.0)	0.709
II	20 (35.0)	30 (53.0)	7 (12.0)		11 (30.0)	19 (53.0)	6 (17.0)	
III	12 (40.0)	15 (50.0)	3 (10.0)		10 (48.0)	10 (48)	1 (4.0)	
ER status								
ER+	26 (34.0)	40 (53.0)	10 (13.0)	0.244	17 (35.0)	25 (52.0)	6 (13.0)	0.881
ER-	9 (56.0)	6 (38.0)	1 (6.0)		5 (42.0)	6 (50.0)	1 (8.0)	
PR status								
PR+	25 (39.0)	33 (52.0)	6 (9.0)	0.388	17 (41.5)	17 (41.5)	7 (17.0)	0.049
PR-	9 (36.0)	11 (44.0)	5 (20.0)		5 (28.0)	13 (72.0)	0 (0.0)	
HER2 status								
HER+	2 (40.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	0.690	3 (75.0)	0 (0.0)	1 (25.0)	0.101
HER-	33 (38.0)	43 (49.0)	11 (13.0)		19 (34.0)	31 (55.0)	6 (11.0)	
Age at diagnosis								
≤ 45 years	8 (36.0)	12 (55.0)	2 (9.0)	0.667	6 (43.0)	7 (50.0)	1 (7.0)	0.862
≥ 46 years	37 (44.0)	37 (44.0)	10 (12.0)		20 (36.0)	29 (53.0)	6 (11.0)	

a: infiltrating ductal carcinoma

Table 4: GSTP1 and CYP17 genotype distribution according to ovarian tumor features.

	GSTP1				CYP17			
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	P	A1/A1	A1/A2	A2/A2	P
Histological type	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	N (%)	
Ser cystadenoc ^a	2 (29.0)	4 (57.0)	1 (14.0)	0.346	1 (25.0)	3 (75.0)	0 (0.0)	0.198
Muc cystadenoc ^b	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Others malignant	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)		2 (67.0)	1 (33.0)	0 (0.0)	
Metastatic tumors	4 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		1 (50.0)	0 (0.0)	1 (50.0)	
Borderline tumor	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (33.0)	2 (67.0)	
Age at diagnosis								
≤ 50 years	3 (43.0)	4 (57.0)	0 (0.0)	0.461	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (100.0)	0.027
≥ 51 years	7 (50.0)	5 (36.0)	2 (14.0)		4 (40.0)	5 (50.0)	1 (10.0)	

^a Serous cystadenocarcinoma^b Mucinous cystadenocarcinoma

Table 5: GSTP1 and CYP17 association with MSI and LOH in AR, ERβ and CYP19 genes, stratified by ER/PR status in breast cancer.

GSTP1 vs AR								CYP17 vs AR									
Genotype	M/L ^a	ER+/ER-	p	OR	PR+/PR-	p	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	p	OR	PR+/PR-	p	OR		
				(95% CI)									(95% CI)				
Ile/Ile	+	0/2	0.077	und	0/2	0.082	und	A1/A1	+	0/1	0.238	und	0/1	0.238	und		
	-	22/7			21/7				-	16/4			16/4				
Ile/Val	+	1/0	0.900	0.0 (0.0-200.0)	1/0	0.790	0.0 (0.0-72.9)	A1/A2	+	0/1	0.185	und	0/1	0.423	und		
	-	35/4			29/8				-	22/4			15/10				
Val/Val	+	0/1	0.111	und	0/1	0.555	und	A2/A2	+	0/0	und	und	0/0	und	und		
	-	8/0			4/4				-	5/1							
GSTP1 vs ERβ								CYP17 vs ERβ									
Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR		
				(95% CI)									(95% CI)				
Ile/Ile	+	0/1	0.381	und	0/1	0.350	und	A1/A1	+	0/1	0.210	und	0/1	0.210	und		
	-	13/7			13/6				-	15/3			15/3				
Ile/Val	+	0/2	0.028	und	0/2	0.097	und	A1/A2	+	0/1	0.250	und	0/1	0.521	und		

	-	27/4			21/8				-	18/5			11/11		
Val/Val	+	0/0	und	und	0/0	und	und	A2/A2	+	0/0	und	und	0/1	und	und
	-	4/0			3/1				-	4/1			5/0		

GSTP1 vs CYP19								CYP17 vs CYP19								
Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	
				(95% CI)									(95% CI)			(95% CI)
Ile/Ile	+	1/0	0.727	0.0 (0.0-51.0)	0/1	0.281	und	A1/A1	+	0/0	und	und	0/0	und	und	
	-	23/9			23/8				-	17/5			17/5			
Ile/Val	+	1/1	0.251	7.60 (0.0-346.2)	1/1	0.451	3.1 (0.0-127.9)	A1/A2	+	1/0	0.800	0.0 (0.0-81.1)	0/1	0.448	und	
	-	38/5			31/10				-	23/6			16/12			
Val/Val	+	0/1	0.111	und	0/1	0.555	und	A2/A2	+	1/0	0.857	0.0 (0.0-636.3)	1/0	und	und	
	-	8/0			4/4				-	5/1			6/0			

GSTP1 vs AR								CYP17 vs AR							
Genotype	M/L ¹	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR
		(95% CI)			(95% CI)					(95% CI)			(95% CI)		
Ile/Ile	+	0/2	0.077	und	0/2	0.082	und	A1/A1	+	0/1	0.238	und	0/1	0.238	und
	-	22/7			21/7				-	16/4			16/4		
Ile/Val	+	1/0	0.900	0.0 (0.0-200.0)	1/0	0.790	0.0 (0.0-72.9)	A1/A2	+	0/1	0.185	und	0/1	0.423	und

Val/Val	-	35/4			29/8			A2/A2	-	22/4			15/10			
	+	0/1	0.111	und	0/1	0.555	und		+	0/0	und	und	0/0	und	und	
	-	8/0			4/4				-	5/1						
GSTP1 vs ERβ								CYP17 vs ERβ								
Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	
				(95% CI)									(95% CI)			(95% CI)
Ile/Ile	+	0/1	0.381	und	0/1	0.350	und	A1/A1	+	0/1	0.210	und	0/1	0.210	und	
	-	13/7			13/6				-	15/3			15/3			
Ile/Val	+	0/2	0.028	und	0/2	0.097	und	A1/A2	+	0/1	0.250	und	0/1	0.521	und	
	-	27/4			21/8				-	18/5			11/11			
Val/Val	+	0/0	und	und	0/0	und	und	A2/A2	+	0/0	und	und	0/1	und	und	
	-	4/0			3/1				-	4/1			5/0			
GSTP1 vs CYP19								CYP17 vs CYP19								
Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	
				(95% CI)									(95% CI)			(95% CI)
Ile/Ile	+	1/0	0.727	0.0 (0.0-51.0)	0/1	0.281	und	A1/A1	+	0/0	und	und	0/0	und	und	
	-	23/9			23/8				-	17/5			17/5			
Ile/Val	+	1/1	0.251	7.60 (0.0-346.2)	1/1	0.451	3.1 (0.0-127.9)	A1/A2	+	1/0	0.800	0.0 (0.0-81.1)	0/1	0.448	und	
	-	38/5			31/10				-	23/6			16/12			

Val/Val	+	0/1	0.111	und	0/1	0.555	und	A2/A2	+	1/0	0.857	0.0 (0.0-636.3)	1/0	und	und
	-	8/0			4/4				-	5/1			6/0		

a: MSI+LOH

Table 6: GSTP1 and CYP17 association with AR, ERβ and CYP19, stratified by ER/PR status in breast cancer.

GSTP1 vs AR + ERβ								CYP17 vs AR + ERβ									
Genotype	M/L ^a	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR		
				(95% CI)									(95% CI)				
Ile/Ile	+	0/2	0.147	und	0/2	0.122	und	A1/A1	+	0/2	0.039	und	0/2	0.039	und		
	-	12/6			12/5				-	14/2			14/2				
Ile/Val	+	1/2	0.060	16.7 (0.8-686.7)	1/2	0.176	6.7 (0.4-228.1)	A1/A2	+	0/1	0.238	und	0/1	0.500	und		
	-	25/3			20/6				-	16/4			10/9				
Val/Val	+	0/1	0.200	und	0/1	0.400	und	A2/A2	+	0/0	und	und	0/0	und	und		
	-	4/0			3/1				-	4/1			5/0				
GSTP1 vs AR + CYP19								CYP17 vs AR + CYP19									
Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR		
				(95% CI)									(95% CI)				
Ile/Ile	+	1/2	0.195	6.0 (0.3-199.8)	0/3	0.021	und	A1/A1	+	0/1	0.238	und	0/1	0.238	und		
	-	21/7			21/6				-	16/4			16/4				
Ile/Val	+	2/1	0.337	4.1 (0.0-89.8)	2/1	0.567	1.69 (0.0-29.8)	A1/A2	+	1/1	0.342	5.3 (0.0-257.8)	0/2	0.169	und		

Val/Val	-	33/4			27/8			A2/A2	-	21/4			15/9				
	+	0/1	0.111	und	0/1	0.555	und		+	1/0	0.833	0.0 (0.0-527.4)	1/0	und	und		
	-	8/0			4/4				-	4/1			5/0				
GSTP1 vs ERβ + CYP19								CYP17 vs ERβ + CYP19									
Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR		
				(95% CI)									(95% CI)				
Ile/Ile	+	1/1	0.653	1.6 (0.0-71.2)	0/2	0.123	und	A1/A1	+	0/1	0.210	und	0/1	0.210	und		
	-	11/7			12/5				-	15/3			15/3				
Ile/Val	+	1/2	0.083	12.5 (0.6-465.2)	1/2	0.251	4.8 (0.3-156.0)	A1/A2	+	1/1	0.462	3.2 (0.0-150.4)	0/2	0.286	und		
	-	25/4			19/8				-	16/5			10/10				
Val/Val	+	0/1	0.200	und	0/1	0.400	und	A2/A2	+	1/0	0.800	0.0 (0.0-418.5)	1/0	und	und		
	-	4/0			3/1				-	3/1			4/0				
GSTP1 vs AR + ERβ + CYP19								CYP17 vs AR + ERβ + CYP19									
Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR	Genotype	M/L	ER+/ER-	P	OR	PR+/PR-	P	OR		
				(95% CI)									(95% CI)				
Ile/Ile	+	1/2	0.344	3.7 (0.2-129.9)	0/3	0.036	und	A1/A1	+	0/2	0.039	und	0/2	0.039	und		
	-	11/6			12/4				-	14/2			14/2				

Ile/Val	+	2/2	0.119	7.7 (0.5-143.0)	2/2	0.318	3.0 (0.2-41.3)	A1/A2	+	1/1	0.428	3.8 (0.0-187.2)	0/2	0.237	und
	-	23/3			18/6				-	15/4			10/8		
Val/Val	+	0/1	0.200	und	0/1	0.400	und	A2/A2	+	1/0	0.800	0.0 (0.0-418.5)	1/0	und	und
	-	4/0			3/1				-	3/1			4/0		

a: MSI+LOH

Molecular and Cellular Biochemistry

Steroid metabolism gene polymorphisms and their implications on breast and ovarian cancer prognosis

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Steroid metabolism gene polymorphisms and their implications on breast and ovarian cancer prognosis
Article Type:	Original Research
Keywords:	Breast and ovarian cancer; GSTP1; CYP17; STR markers; polymorphisms.
Corresponding Author:	Iuri Louro, M.D., Ph.D. Universidade Federal do Espírito Santo Vitória, ES BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Espírito Santo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Eldamaria de Vargas Wolfgramm
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Eldamaria de Vargas Wolfgramm
	Lyvia Neves Rebello Alves
	Marcelo dos Santos
	Flavia de Paula
	Iuri Louro, M.D., Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Suggested Reviewers:	Jose Lima Red Cross, GA, USA jose.lucio.lima@gmail.com Reviewer is an expert pathologist and molecular biologist. Has large research experience and will be very suitable for the analysis of the manuscript. USA
	Vitor Aguiar Berkeley, CA, USA vitor.rca@gmail.com Reviewer is currently at Berkeley, USA and has large experience with molecular biology and molecular markers. USA
	Adriana Madeira Campos Alegre, UFES, Brazil adriana.biomol@gmail.com Reviewer has large experience in tumor molecular biology and molecular markers. Brazil.
	Jose Rocha INCA (Instituto do Cancer) joseclaudior@uol.com.br Reviewer is expert oncogeneticist with large clinical experience in the field.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

Para a realização do levantamento epidemiológico, foram coletados dados em dois hospitais considerados referência em oncologia no estado do Espírito Santo: Hospital Santa Rita de Cássia e Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória.

Foram analisados, aproximadamente, 72.000 prontuários nos dois hospitais, entre os quais foram observados 1.758 tumores malignos da mama e 119 tumores malignos do ovário.

Com relação aos tumores malignos da mama, similaridades foram encontradas entre a idade média de diagnóstico das pacientes deste estudo (53,59 anos) e a das pacientes residentes na cidade de Florianópolis (SC), enquanto diferenças foram observadas entre a frequência dos receptores hormonais nos diferentes grupos etários das pacientes do estudo em relação aos casos de câncer de mama de mulheres da cidade de Ribeirão Preto e Florianópolis (SC).

O carcinoma ductal infiltrante foi o tumor maligno mais frequente. Os casos triplo-negativos deste tipo histológico apresentaram uma frequência significativa em mulheres com idade ≤ 35 anos, resultado este corroborado com a hipótese de que tumores em mulheres jovens apresentam um pior prognóstico.

Um aumento na frequência da categoria outros tumores malignos da mama foi observado no período de 2009-2010 em relação ao período de 2001 a 2004, em mulheres com idade ≤ 35 anos. Este aumento, assim como o observado para os casos de carcinoma ductal infiltrante em mulheres com idade ≥ 36 anos durante os anos de 2009-2010 em relação ao período de 2001 a 2004, pode ser decorrente de melhoras no programa de rastreamento do câncer de mama no Brasil.

Em relação aos tumores malignos do ovário, foi observado que os casos analisados nos dois hospitais do ES apresentaram idade média de diagnóstico de 52,98 anos, a qual assemelhou-se às idades de diagnóstico apresentadas pelos casos de câncer de ovário das cidades de São Paulo e de Jundiaí, ambas localizadas no estado de São Paulo.

6.2 ANÁLISE DE MARCADORES DO TIPO STR

As análises moleculares foram realizadas em 107 casos de câncer de mama e em 24 casos de câncer de ovário diagnosticados em mulheres residentes no ES.

Em relação aos casos de câncer de mama foi observado que:

- A MSI-L parece ser mais frequentemente encontrada nos carcinomas mamários que a MSI-H, quando a MSI ocorre no câncer de mama.
- LOH foi um evento observado com maior frequência, em relação à MSI, nos 12 marcadores analisados.
- LOH nos marcadores D17S250, AR e ER β foi correlacionada com tumores que apresentavam alguma característica de pior prognóstico como: grau histológico III, tumores ER negativos e tumores PR negativos.
- A análise de combinação de marcadores do tipo STR, na qual foram consideradas as alterações totais (MSI+LOH), demonstrou que a associação dos mesmos pode apresentar um valor preditivo maior que a análise de um marcador individual.
- A combinação de MSI+LOH nos marcadores AR, CYP19 e ER β apresentou uma correlação com tumores de pior prognóstico como: grau histológico III, tumores ER negativos e tumores PR negativos. Esses achados demonstram que alterações do tipo MSI/LOH em genes de suscetibilidade relacionados à biossíntese dos hormônios androgênio e estrogênio podem ter um papel importante na carcinogênese mamária.

Em relação aos casos de câncer de ovário, observou-se que:

- LOH foi um evento mais frequentemente observado que a MSI nos 12 marcadores analisados.
- A presença de LOH no marcador D17S250 demonstrou uma correlação positiva com tumores do tipo cistadenocarcinoma mucinoso, o que poderia indicar que o cromossomo 17 tenha uma regra importante na carcinogênese do ovário.
- A combinação de MSI+LOH no marcador ER α apresentou correlações significantes com os casos de cistadenocarcinoma seroso e mucinoso, o que corrobora com a hipótese que genes envolvidos com os hormônios esteroides podem ter um papel importante na carcinogênese ovariana.

- No entanto, a combinação de marcadores do tipo STR não demonstrou nenhum resultado significativo para os tipos histológicos e idade ao tempo de diagnóstico.

6.3 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS EM GSTP1 E CYP17

Em relação ao câncer de mama:

- Não foram observadas diferenças significantes na frequência alélica e genotípica dos polimorfismos A313G em GSTP1 e T27C em CYP17 entre os casos de câncer de mama e os casos controles do nosso estudo.
- A distribuição dos genótipos de GSTP1 e CYP17 por parâmetros clínicos e histopatológicos demonstrou uma associação significativa entre portadoras do genótipo A2/A2 no gene CYP17 e tumores PR positivos. Para o GSTP1 não foram observados associações significantes entre os genótipos e os parâmetros clínicos e histopatológicos analisados.
- A combinação entre os genótipos de GSTP1 e CYP17 por parâmetros clínicos e histopatológicos também foi realizada, mas não demonstrou resultados significantes.

Em relação ao câncer de ovário:

- Não foram observadas diferenças significantes na frequência alélica e genotípica dos polimorfismos A313G em GSTP1 e T27C em CYP17 entre os casos de câncer de ovário e as mulheres incluídas como controle no nosso estudo.
- A distribuição dos genótipos de GSTP1 e CYP17 pelos parâmetros: idade ao tempo de diagnóstico e tipo histológico demonstrou uma associação positiva somente em portadoras do genótipo A2/A2 no gene CYP17 para idade ao tempo de diagnóstico ≤ 50 anos.
- A combinação dos genótipos de GSTP1 e CYP17 pelos parâmetros: idade ao tempo de diagnóstico e tipo histológico não demonstrou resultados significantes.

6.4 ANÁLISE DA COMBINAÇÃO DE MSI/LOH NOS MARCADORES DO TIPO STR E POLIMORFISMOS NOS GENES GSTP1 E CYP17

Para a análise de combinação de MSI/LOH nos marcadores do tipo STR com os polimorfismos nos genes GSTP1 e CYP17 foram selecionados os STRs AR, CYP19 e ER β , pois foram os marcadores que apresentaram correlação positiva com alguns parâmetros histopatológicos nos casos de câncer de mama.

Estratificando MSI+LOH nos marcadores do tipo STR por genótipos dos genes GSTP1 e CYP17 foram observadas, nas amostras de câncer de mama, associações positivas em:

- Portadoras do genótipo Ile/Ile no GSTP1, as quais apresentavam frequências de MSI/LOH significantes nos marcadores AR+CYP19 em tumores PR negativos em relação aos tumores PR positivos.
- Portadoras do genótipo Ile/Ile no GSTP1, as quais apresentavam frequências de MSI/LOH significantes nos marcadores AR+CYP19+ER β em tumores PR negativos em relação aos tumores PR positivos.
- Portadoras do genótipo A1/A1 no CYP17, as quais apresentavam frequências de MSI/LOH significantes nos marcadores AR+ER β em tumores ER e PR negativos em relação aos tumores ER e PR positivos.
- Portadoras do genótipo A1/A1 no CYP17, as quais apresentavam frequências de MSI/LOH significantes nos marcadores AR+CYP19+ER β em tumores ER e PR negativos em relação aos tumores ER e PR positivos.

Esses resultados postulam a hipótese que os genótipos Ile/Ile no gene GSTP1 e A1/A1 no gene CYP17, quando associados à MSI/LOH nos marcadores AR, CYP19 e ER β , poderiam estar correlacionados à características de pior prognóstico no câncer de mama, sugerindo, por sua vez, que genes relacionados a biossíntese e metabolismo de hormônios esteroides poderiam ajudar na caracterização do prognóstico do câncer de mama.

Em relação ao câncer de ovário, também foram realizadas as análises de combinação entre MSI/LOH nos marcadores AR, CYP19, ER β e ER α por genótipos dos genes GSTP1 e CYP17. No entanto, não foram observados resultados significantes, provavelmente, decorrente do número limitado de amostras.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 30 de Abril de 2009

Da: Profa. Ethel Leonor Noia Maciel
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

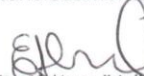
Para: Prof. Iuri Drumond Louro
Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Biomarcadores no câncer de mama e ovário: uma correlação entre alterações genéticas e aspectos histopatológicos”**

Senhor Pesquisador,

Informamos à Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar Projeto de Pesquisa, **Nº de registro no CEP – 002/09**, intitulado: **“Biomarcadores no câncer de mama e ovário: uma correlação entre alterações genéticas e aspectos histopatológicos”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 29 de Abril de 2009.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,


Prof.ª Dra. Ethel Leonor Noia Maciel
COORDENADORA
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Ciências da Saúde/UFES

APÊNDICE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO GRUPO CONTROLE

I – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Título: *"Biomarcadores no câncer de mama e ovário: uma correlação entre alterações genéticas e aspectos histopatológicos"*

Pesquisadores: Iúri Drumond Louro – professor da UFES, Dept°. de Ciências Biológicas.

II - INFORMAÇÕES PARA CONTATO:

Endereço: Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Biologia / CCHN – UFES; Av. Marechal Campos 1468, Vitória- ES. Cep: 29040090. Telefone: (027) 3335-7253

Descrição da Pesquisa:

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres, enquanto o câncer de ovário é o câncer ginecológico mais difícil de ser diagnosticado, pois a doença frequentemente não causa nenhum sintoma até que se espalhe além dos ovários, nos estágios mais avançados do tumor. Várias alterações genéticas parecem estar associadas ao câncer de mama e de ovário. O objetivo desta pesquisa então é analisar algumas variações, denominadas polimorfismos, em regiões do DNA afim de identificar variações correlacionadas com o câncer de mama e de ovário. Para isso, precisamos estudar o DNA da população normal do Espírito Santo, afim de caracterizar e diferenciar o comportamento deste DNA em relação aos indivíduos com câncer de mama e/ou ovário na população do estado. É importante falar que você não é obrigado a participar deste estudo, este é um estudo voluntário. Quem concordar em participar desta pesquisa deve preencher este termo de consentimento e permitir a coleta de 5mL de sangue.

Avaliação do risco da pesquisa: RISCO MÍNIMO

O risco mínimo se refere a eventual possibilidade de uma pequena vermelhidão e/ou dor mínima no local da coleta de sangue. Todo material utilizado é descartável e a coleta será feita por um profissional capacitado, dessa forma, não haverá risco à sua saúde.

III- DIREITOS E GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Você não é obrigado a participar desta pesquisa. Os indivíduos que quiserem participar têm acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para fazer perguntas que esclareçam suas dúvidas. Você pode retirar o seu consentimento a qualquer momento e a não participação neste projeto de pesquisa não implicará em nenhum prejuízo a você. Não haverá gastos para os indivíduos que quiserem participar da pesquisa e também não terá nenhum ganho material. A identidade dos participantes não será revelada e a confidencialidade, sigilo e privacidade dos participantes serão preservados. A sua amostra de sangue não será armazenada, sendo eliminada como lixo hospitalar sem identificação após a análise dos resultados nesse projeto de pesquisa. Não estão previstas formas de ressarcimento ou indenizações durante a pesquisa.

IV - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA:

NOME DO PACIENTE:.....
SEXO: M () F () DATA NASCIMENTO:/...../..... IDADE:.....
ENDEREÇO:.....
ETNIA:..... TELEFONE: (.....)

V - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Local e data

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador responsável